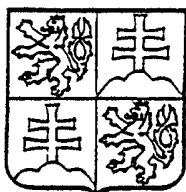


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00291-91.M

(13) A3

(22) 07.02.91

(32) 15.02.90

(31) 90/481342

(33) US

(40) 17.06.92

5(51) C 12 P 21/02.
C 12 N 15/11.
9/12.
15/63.
//A 61 K 37/02

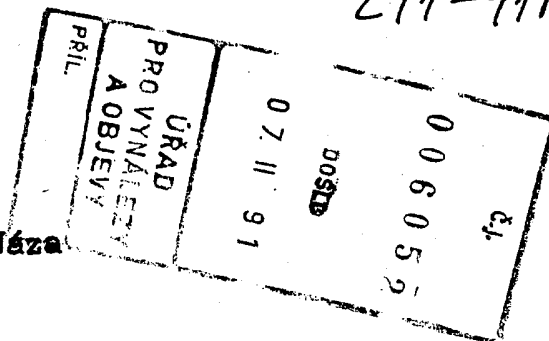
(71) President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Massachusetts, US

(72) Vallee Bert L., Brookline, Massachusetts, US
Bond Michael D., Brighton, Massachusetts, US

(54) Kovalentní hybridy angiogenin/RNáza

(57)

Je popisována regionální mutagenese genu pro angiogenin pro přípravu DNA sekvencí kodujících mutantní proteiny, mající zvýšenou angiogenní aktivitu. Vektory pro expresi obsahující tyto sekvence jsou zaváděny do hostitelské buňky a řídí produkci mutantních angiogenních proteinů s výrazně zvýšenou angiogenní aktivitou. Přemístění aminokyselin v oblasti při nebo odpovídajících zbytkům 8-22 angiogeninu s dalšími aminokyselinami, zejména s aminokyselinami odpovídajícími zbytkům 7-21 RNázy, neočekávaně vede k hybridnímu proteinu angiogenin/RNáza, který je mutantní, a má 10krát vyšší angiogenní účinnost ve zkoušce choriallantoinové membrány. Další in vivo a in vitro angiogeninové aktivity jsou v mutantním hybridním proteinu změněny. Mutantní angiogenin/RNázové hybridní proteiny jsou vhodnými terapeutickými kompozicemi k promotování vývoje hemovaskulárního řečiště u savců nebo při promotování hojení poranění, zejména hojení roztrženého nebo traumatizovaného chrupavčitého materiálu.



Kovalentní hybridy angiogenin/RNáza

Oblast vynálezu

Předložený vynález se týká modifikovaných nebo mutantních proteinů angiogeninu a sekvencí DNA, kodujících tyto modifikované nebo mutantní proteiny. Dále se také týká vektorů, hostitelských buněk a metod exprese modifikovaných nebo mutantních proteinů angiogeninu. Zejména jsou modifikované nebo mutantní angiogenní proteiny podle vynálezu genetickým inženýrstvím zpracované kovalentní angiogenní/ribonukleázové (RNázové) hybridy. Tyto hybridy jsou užitečné pro identifikaci strukturálních komponentů angiogeninu, nezbytných pro charakteristickou aktivitu angiogeninu. Zejména mohou být využity regionální mutagenese pro výrobu takových angiogenin/RNázových hybridních proteinů, které jsou odvozeny od angiogeninu a ve kterých jsou jednotlivé oblasti primární struktury nahrazeny odpovídajícími segmenty RNázy. Příprava a charakteristika takových proteinů dovoluje identifikaci segmentů jako je N-terminální segment, který může být rozhodující při charakteristické aktivitě angiogeninu podle předloženého vynálezu. Přesněji, předložený vynález se týká nových rekombinovaných hybridních proteinů se zvětšeným angiogenním potenciálem - ARH-III, ve kterém je N-terminální konec 8-22 zbytků angiogeninu nahrazen odpovídajícím úsekem (zbytky 7-21) RNázy regionální mutagenézí. Takový rekombinovaný mutantní protein angiogeninu může být produkován v dostatečném množství pro umožnění jeho aplikace v terapii a diagnostice.

Dosavadní stav techniky

Angiogeneze, proces vývoje krevního řečiště, je základem pro růst solidních tumorů a je složkou normálních hojivých a růstových procesů. Také je zahrnuta v patofyziologii atherogenese, artritidy a diabetické retinopatie. Je charakterizována řízeným růstem nových kapilár směrem ke specifickým

stimulům. Tento růst je zprostředkován migrací endotelových buněk, může postupovat nezávisle na mitozách endotelových buněk.

Molekulární messengery, odpovědné za proces angiogeneze byly dlouho vyhledávány. Greenblatt a Shubik, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41: 111-124 soudí, že tumorem indukovaná neovaskularizace je zprostředkována difuzibilní substancí. Následně se uvažovalo o různých rozpustných mediátorech indukujících neovaskularizaci. Tyto zahrnují prostaglandiny (Auerbach, v Lymphokines, Pick and Landy, eds., 69-68. Academic Press, New York, 1981), lidskou urokinázu (Berman a spol., 1982, Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 22:191-199), měď (Raju a spol., 1982, J. Natl. Cancer Inst. 69:1183-1188) a různé "Angiogenezní faktory".

Různé angiogenezní faktory byly odvozeny z tumorových buněk, z moku, pocházejícího ze zranění (Banda a spol., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7773-7777; Banda a spol., US patent č. 4503038) a buněk sítnice (D'Amore, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3068-3072). Angiogenezní faktory odvozené z tumorů byly charakterizovány v menším rozsahu. Folkman a spol., 1971, J. Exp. Med. 133:275-288, izoloval angiogenezní faktor z Walker 256 vodnatelného nádoru krysy. Faktor byl mitogenní pro endotheliální bunky kapilár a byl inaktivován RNázou. Tuan a spol., 1973, Biochemistry 12:3159-3165, našel mitogenní a angiogenní aktivitu v nehistonových proteinech Walker 256 tumoru. Aktivní frakcí byla směs proteinů a karbohydrátů. Množství zvířecích a lidských tumorů může produkovat angiogenezní faktor(y) (Phillips a Kumar, 1979, Int. J. Cancer 23:82-88, ale nebyla stanovena chemická povaha tohoto faktoru(ů). Nепroteinové komponenty o nízké molekulové hmotnosti z Walker 256 tumorů se mohou také projevit jako angiogenní a mitogenní (Weiss a spol., 1979, Br. J. Cancer 40:493-496). Angiogenezní faktor s molekulovou

hmotností 400 až 800 daltonů byl vyčištěn do homogenity Fenselauem a spol., 1981, J.Biol.Chem. 256:9505-9611, ale nebyl dále charakterizován. Buněky lidského plicního nádoru vykazovaly sekreci angiogenních faktorů, zahrnujících nosič o vysoké molekulové hmotnosti a aktivní komponentu o nízké molekulové hmotnosti, která je patrně neproteinového charakteru (Kumar a spol., 1983, Int.J.Cancer 32:461-464). Vallee a spol., 1985, Experientia 41:1-15, našli angiogenní aktivitu sestávající se ze tří frakcí z Walker 256 tumorů. Tolbert a spol. (US patent č. 4229531) objevil produkci angiogenních faktorů z lidské linie HT-29 adenokarcinomu, ale materiál byl pouze částečně vyčištěn a nebyl chemicky charakterizován. Izolace genů, odpovídajících za produkci výše popsaných angiogenních faktorů, nebyla uvedena, z části je toto způsobeno nedostatkem čistoty a charakteristiky faktorů.

K izolaci angiogenních faktorů je využíváno množství různých technik zahrnujících: vysokotlakovou kapalinovou chromatografii (Banda a spol., supra), extrakci rozpouštědly (Folkman a spol., supra), chromatografii na silikagelu (Fenselau a spol., supra), DEAE celuloze (Weiss a spol., supra) nebo Sephadexu (Tuan a spol., supra) a afinitní chromatografii (Weiss a spol., supra).

Vallee a spol. (US patent č. 4727137, který je zde uveden jako odkaz) vyčistil angiogenní protein z lidské buněčné linie adenokarcinomu. Tento protein byl identifikován v normální lidské plazmě (Shapiro a spol., 1987, Biochem. 26: 5141-5146). Vyčištěný protein známý jako angiogenin byl chemicky charakterizován a byla stanovena jeho aminokyselinová sekvence. Byly demonstrovány dvě odlišné aktivity pro angiogenin získaný z lidských tumorů. První byla popsána jako velmi potentní angiogenní faktor in vivo (Fett a spol.,

1985, Biochem. 24:5480-5486). Druhá, která byla objevena díky vykazování charakteristické ribonukleolytické aktivity směrem k 28S a 18S rRNA a která se prokazatelně liší od pankreatické RNázy ve dvou bodech: a) je třeba 10^5 více angioteninu než RNázy k dosažení stejného stupně degradace rRNA, a b) produkty jsou mnohem delší, např. ze 100 na 500 nukleotidů. Navíc je podstatně inaktivnější vůči klasickým A substrátům RNázy (Shapiro a spol., 1986, Biochem. 25:3627-3532; St.Clair a spol., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8330-8334).

Dále Vallee a spol (US patent č. 4721672 uvedený jako odkaz), klonovali geny (jak cDNA tak genomové) kodující angiotenní protein nárokováný v US patentu č. 4727137 z knihovny lidské jaterní cDNA a knihovny lidského genomu. Gen angioteninu byl klonován do vektoru a rekombinované vektory kodující gen angioteninu byly použity pro transformování nebo transfekci hostitelských buněk. Takové transformované nebo transfektované buňky produkují lidský angiotenní protein.

Na základě sekvence genu pro angiotenin, objevené a nárokované v US patentu č. 4721672, připravovalo několik skupin syntetické angioteninové geny. Deneffe a spol., 1987, Gene 56:61-70, připravili syntetické geny, kodující lidský angiotenin, který byl potvrzen jako vhodný pro vyhledávání kodonů v proteinech produkovaných E.coli. Syntetické geny byly ligovány do pBR322-odvozeného expresního vektoru konstruovaného tak, aby obsahoval E.coli tryptofan (trp) promotor. Angiotenin produkovaný E.coli je nerozpustný, ale může být snadněji renaturován a čištěn. Čištěný angiotenin vykazuje angiotenní a ribonukleotickou aktivitu stejnou jak popsal Vallee a spol. (US patent č. 4727137) pro přirozený čištěný angiotenin z buněk lidského adenokarcinomu. Jiný syntetický gen pro angiotenin byl připraven Hoechstem (německá patentová přihláška P3716722.7), kodující na 30. pozici aminokyselin

leucin místo methioninu v přírodním (tj. divokém typu) genu angiogeninu popsaného a chráněného v US patentu č. 4721672. Tento syntetický Leu-30 angiogenní gen byl označen za vhodný pro využití kodonů výhodně produkovaných v *E.coli*. Gen byl vklonován do vektoru, obsahujícího modifikovaný trp promotor (evropská patentová přihláška 0198415) a oblast iniciující translaci (TIR) sekvence (Gene 41: 201-206, 1986; EMBO J. 4:519-526, 1985) pro zvýšení účinnosti translace. Syntetický gen je takto pod přímou kontrolou trp promotoru a exprese je indukována doplněním indol-3-akrylové kyseliny nebo nedostatkem tryptofanu. Leu 30 angiogeninový protein vykazuje po vyčištění stejnou angiogenní a ribonukleotickou aktivitu jako divoký typ (Met-30) angiogeninu.

Všechny právě popsané lidské angiogeniny, ať získané z plasmy, nádorových buněk nebo rekombinací DNA (cDNA, genomové DNA nebo syntetické DNA) vykazují angiogenní i ribonukleolytickou aktivitu. Jedním z nejpoutavějších rysů angiogeninu je jistě jeho strukturální homologie se savčí pankreatickou RNázou. Tato strukturální podobnost by mohla umožnit studium mechanismu akce angiogeninu jakož i podobnosti mezi angiogeninem a enzymatickou (tj. ribonukleolytickou) aktivitou angiogeninu.

In vivo je angiogenin silným induktorem růstu krevních cest, jak bylo měřeno na kuřecích choriallantoických membránách (CAM) a králičí cornea studii (Fett a spol., Biochemistry 24:5480-5486). *In vitro* angiogenin indukuje různé reakce v endoteliálních buňkách, zahrnující aktivaci fosfolipázy C a sekreci prostaglandinů (Bicknell and Vallee, 1988, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 85:5961-5965, Bicknell a Vallee, 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1573-1577); inhibuje také volnou translaci v buňkách specifickým rozštěpením 18S RNA ve 40S ribozomální podjednotce (St.Clair a spol., 1987, Proc.Natl.

Acad.Sci.USA 84:8330-8334; St.Clair a spol., 1988, Biochemistry 27: 7263-7268).

Angiogenin je strukturně homologní se skupinou enzymů pankreatické RNázy, mající 34 % sekvencí identických s nejvíce studovaným členem této skupiny, hovězí pankreatickou RNázou A (RNáza A (Strydom a spol., 1985, Biochemistry 24: 5486-5494; Kurachi a spol., 1985, Biochemistry 24: 5494-5499)). Terciární struktura angiogeninu je podobné této RNáze A vzhledem k i) zachování tří ze čtyř disulfidových vazeb, ii) extrémně těsné vazbě k inhibitoru placentární ribonukleázy (PRI) (Shapiro a Vallee, 1987, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2238-2241; Lee a spol., 1989b, Biochemistry 28: 225-230; Blackburn a spol., 1977, J.Biol.Chem. 252:5904-5910) a iii) počítačem vytvořené trojrozměrné struktury (Palmer a spol., 1986, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:1965-1969). Tři nezbytné katalytické zbytky RNázy A (His-12, Lys-41 a His-119) jsou uchovány v angiogeninu (His-13, Lys-40 a His-114) stejně jako mnoho dalších klíčových míst a strukturálních zbytků. Jak bylo uvedeno výše, angiogenin má ribonukleolytickou aktivitu, ale typem velmi rozdílnou od jiných RNáz. Aktivita angiogeninu vůči nejběžnějším substrátům je 5 až 6krát řádově nižší než aktivita RNázy A (Shapiro a spol., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:8783-8787; Shapiro a spol., 1988, Anal.Biochem. 175:450-461; Harper a Vallee, 1989, Biochemistry 28: 875-84). Navzdory strukturním podobnostem, ohromný rozdíl v aktivitě angiogeninu in vivo a in vitro, vztažené k aktivitě RNáz (u kterých nebyla prokázána indukce angiogeneze nebo druhé messengerové aktivity) je jasným důkazem odlišné fyziologické funkce angiogeninu.

Výsledky studií ukázaly, že aktivní místa histidinových a lysinových zbytků angiogeninu jsou potřebná pro dvojce aktivity - angiogenní a ribonukleolytickou (Shapiro a spol., 1986, Biochemistry 25:3527-3532; Shapiro a spol., 1987b, Proc.

Natl.Acad.Sci.USA 84:8783-8787; Shapiro a spol., 1988b, Biochem.Biophys.Res.Comm.156: 530-536; Shapiro a spol., 1989, Biochemistry 28: 1726-32 a Shapiro a Vallee, 1989, Biochemistry 28:7401-8). Nicméně další molekulové vlastnosti musí být kritické pro angiogenezi, poněvadž hovězí pankreatická RNázy obsahuje odpovídající histidinové a lysinové zbytky přesto, že není angiogenní. Takové doplňující molekulární rysy, jestliže mohou být zjištěny, by měly zahrnovat individuální zbytky a/nebo oblasti sekvence, které jsou unikátní pro angiogenin. Harper a Vallee, 1989, Biochem. 28:1875-84, připouští, že jeden nápadný strukturní rozdíl mezi angiogeninem a RNázou spočívá v absenci sekvence podobné oblasti RNázy, obsahující Cys-65-Cys-72 disulfidovou vazbu. Angiogenin postrádá tyto disulfidické vazby. Vzhledem k tomu, že tato oblast angiogeninu je identifikována (Harper a Vallee, 1989, supra, byl popsán nový, genetickým inženýrstvím vyrobený kovalentní angiogenní/RNázový hybridní protein, ARH-I, ve kterém segmenty angiogeninu zahrnující aminokyselinové zbytky 58-70 byly nahrazeny odpovídajícími segmenty (zbytky 59-73) RNázy A. Nahrazení tohoto segmentu angiogeninu genetickým inženýrstvím odpovídajícím segmentem z RNázy A podmiňuje vznik kovalentního hybridního proteinu s charakteristikami podobnějšími RNáze. ARH-I vykazuje enzymatickou aktivitu překvapivě podobnou aktivitě RNázy, ale znatelně sníženou angiogenní biologickou aktivitu. Harper a Vallee, 1989, supra, nebyli schopni připravit nebo identifikovat protein, ve kterém by byla zvýšena biologická angiogenní aktivita. Takový hybrid by byl neočekávaný vzhledem k jejich experimentálnímu záměru vložit unikátní oblast RNázy do angiogeninu.

Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že nahrazení unikátních segmentů angiogeninu, zahrnujících N-terminální aminokyseliny při nebo odpovídající zbytkům 8-22 angiogeninu, odpovídajícími segmenty

(zbytky 7-21) RNázy A za vzniku nového rekombinovaného proteinu se zvýšenou angiogenní schopností. Podle předkládaného vynálezu N-terminální oblast angiogeninu byla identifikována jako možný kandidát na unikátní oblast angiogeninu a tak považována za určující pro specifickou aktivitu angiogeninu. Tato oblast byla 1) velmi vysoce konzervována v aminokyselinových sekvencích angiogeninu pro čtyři druhy (lidský, hovězí, vepřový a *králík*) a 2) odlišná od odpovídajících oblastí RNázy. Nový rekombinovaný kovalentní hybrid angiogenin/RNáza ARH-III podle předloženého vynálezu tak zahrnuje modifikovaný angiogenin, ve kterém segment blízký N-konci (zbytky 8-22) angiogeninu byl vyměněn regionální mutací s odpovídajícím segmentem RNázy (zbytky 7-21). Tento nový rekombinantní hybrid vykazuje 10krát větší schopnost angiogenní aktivity a vzrůstá vazebná schopnost (alespoň o jeden řád) k placentárnímu ribonukleázovému inhibitoru (PRI) ve srovnání s angiogeninem. Ribonukleolytická aktivita ARH-III byla vůči mnoha substrátům nezměněna. Kapacita ARH-III inhibovat tvorbu volných proteinů v buňce byla snížena 20 až 30krát ve srovnání s angiogeninem. Tyto nové hybridní proteiny, obsahující pentadekapeptidový segment RNázy jsou biologicky aktivnější než samotný angiogenin a jsou tak ve skutečnosti účinnějším angiogeninem.

Popis obrázků

Obrázky 1a a 1b jsou grafy znázorňující procentuální shodu aminokyselinových sekvencí zbytků lidského angiogeninu ve srovnání s toutéž částí hovězího angiogeninu (obr.1a) a RNázy (obr.1b) za účelem stanovení unikátních segmentů angiogeninu jak je popsáno v příkladu 1. Obr.1c je grafem ukazujícím rozdíl v procentuální shodě mezi obr.1a a 1b.

Obr.2a ukazuje N-terminální aminokyselinovou sekvenci RNázy lidského angiogeninu a ARH-III. Zbytky RNázy A obsahuje

né v pankreatické RNáze 39 savčích druhů jsou označeny hvězdičkou. Oramované části v angiogeninu jsou obsaženy v lidských, hovězích, vepřových proteinech a proteinech lapi-nů. Obr.2b ukazuje DNA sekvence syntetického dvojřetězcové-ho oligonukleotidu kodujícího rezidua 4-23 ARH-III použité-ho jako fragmentu B v konstrukci sekvence kodující ARH-III popsané v příkladu 2.

Obr.3 je diagramem konstrukce kodující sekvence pro ARH-III popsaného v příkladu 2.

Obr.4 představuje vymývací profil HPLC tryptických pep-tidů ARH-III popsané v příkladu 4.

Obr.5a je graf znázorňující aktivitu angiogeninu a ARH-III směrem ke kvasinkové tRNA; Obr.5b je grafem představujícím vliv pH na aktivitu ARH-III ve srovnání s RNázou a angio-geninem jak popisuje příklad 5.

Obr.6 je autoradiografem močovino-polyakrylamidového gelu, představujícím vliv angiogeninu a ARH-III na intaktní ribosomy jak je popsáno v příkladu 6.

Obr.7 je graf představující aktivitu ARH-III a angio-geninu v CAM zkoušce jak popisuje příklad 7.

Obr.8 je graf představující disociaci angiogeninu a ARH-III z komplexu protein:PRI během 10 dnů.

Obr.9 je prostorový diagram RNázy A.

Detailní popis vynálezu

Před dalším popisem vynálezu bude užitečné definovat určité termíny a dále je používat.

Biologická aktivita je funkcí nebo souborem funkcí působených molekulou v biologickém kontextu (tj. v organismu nebo in vitro). Pro angiogenin je biologická aktivita charakterizována jeho angiogenní aktivitou (angiogenese). Může také zahrnovat druhotnou messengerovou a/nebo ribonukleolytickou aktivitu. Angiogenní aktivita je chemickou stimulací rozvoje krevního řečiště do tkání. Ta je obecně spojována s produkcí difusibilních substancí různými typy buněk. Angiogenní aktivita může být charakterizována pozitivní odpovědí v testu kuřecích embryonálních chorioallantoických membrán (Knighton a spol., 1977, Br.J. Cancer 35:347-356) a/nebo zkoušce králičích rohovek implantací (Langer a Folkman, 1976, Nature 263:797-800).

Ribonukleolytická aktivita je enzymatické štěpení RNA, zahrnující limitované katalytické štěpení rRNA a tRNA.

Mutantní gen nebo zkonstruovaná DNA je molekula DNA nebo klon takové molekuly, která byla lidským zásahem modifikována tak, aby obsahovala segmenty DNA, které jsou vyměněny, kombinovány nebo umístěny vedle sebe tímto způsobem a které by jinak neměly v přírodě existovat.

Mutantní (mutovaný) angiogenní protein je angiogenní protein nebo nějaký jiný peptidický fragment tohoto proteinu, ve kterém bylo jedna nebo více aminokyselin zaměněno s jinými aminokyselinami a který má alternativní biologickou aktivitu ve srovnání s nemutovanou nebo divokou formou angiogenu.

Výhodnou prokaryotickou buňkou používanou při provádění předkládaného vynálezu je kmen bakterie *Escherichia coli*, ačkoliv je možno také použít *Bacillus* a jiné rody. Technika pro transformaci těchto hostitelských buněk a expresi cizorodých genů, klonovaných do těchto buněk je velmi známá v oboru (viz

např. Maniatis a spol., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987 (před r.1989), Ausubel a spol., vyd. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York; Perbal, 1988, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons, New York; Davis a spol., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., New York). Vektory používané k expresi v bakteriálních hostitelských buňkách budou obvykle obsahovat oddělitelný marker, tak jako gen pro antibiotickou rezistenci a promotor, který funguje v hostitelské buňce. Do vhodných promotorů patří trp (Nichols a Yanofsky, 1983, *Meth.in Enzymology* 101:155) lac (Casadaban a spol., 1980, *J.Bact.* 143:971-980) a fág- λ promotorové systémy. Plasmidy používané pro transformaci bakterií zahrnují pBR322 (Bolivar a spol., 1977, *Gene* 2:95-113), pUC plasmidy (Messing, 1983, *Meth.in Enzymology* 101:20-77 a Vieira a Messing, 1982, *Gene* 19:259-268), pCQV2 (Queen, 1983, *J.Mol.Appl. Genet.* 2:1-10) a jejich deriváty.

Eukaryotické mikroorganismy jako je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, mohou být také použity jako hostitelské buňky. Technika pro transformaci kvasinek je také v oboru známá (viz např. Strathern a spol., 1982, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 2 díl. Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Perbal, 1988, *supra*; Davis a spol., 1986, *supra*; Beggs, 1978, *Nature* 275: 104-108). Exprimované vektory pro použití v kvasinkách zahrnují YEp13 (Broach a spol., 1979, *Gene* 8:121-133), YRp7 (Struhl a spol., 1979, *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 76:1035-1039), pJDB248 a pJDB219 (Beggs, *ibid*) a jejich deriváty. Takové vektory většinou obsahují oddělitelný marker, jako je nutriční marker TRP, který dovoluje selekci v hostitelském kmenu, nesoucím trp1 mutaci. Výhodné promotory pro použití při expresi vektorů v kvasinkách jsou promotory z kvasinkových glykolytických genů (Hitzeman a spol., 1980, *J.*

Biol.Chem. 255:12073-12080; Albert a Kawasaki, 1982, J.Mol. Appl.Genet. 1:419-434) nebo alkohol-dehydrogenázových genů (Young a spol., v Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender a spol.vyd., str.335, Plenum, New York, 1982 a Ammerer, Meth.in Enzymology 101:192-201, 1983). K usnadnění čištění angiogenních proteinů produkovaných kvasinkovými transformanty a k získání vlastní disulfidické vazebné formace, může být signální sekvence, výhodněji z kvasinkového genu, kodujícího secernovaný protein, připojena ke kodující sekvenci pro angiogenní protein. Zvláště výhodnou signální sekvencí je pre-pro oblast MF α 1 genu (Kurjan a Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943).

Vyšší eukaryotické buňky mohou také sloužit jako hostitelské buňky při uskutečňování předloženého vynálezu. Kultury savčích buněk jsou výhodné. Exprimované vektory pro použití v savčích buňkách budou obsahovat promotor schopný řízení transkripce cizího genu vloženého do savčí buňky. Jedním z výhodných promotorů je myší metallothionein-1 (MT-1) (Palmiter a spol., 1983, Science 222:809-814). Signál pro polyadenylaci je také obsažen v exprimovaném vektoru, je lokalizován po směru od vloženého místa. Polyadenylační signál může být takový, který klonuje geny angiogenního proteinu, nebo může být odvozen od heterologního genu. Jiné genové sekvence (např. intronové sekvence) mohou být vkládány a tak zvyšována exprese.

Klonované genové sekvence mohou pak být použity v kultivovaných savčích buňkách způsobem známým v oboru, např. transfekcí za pomoci fosfátu vápenatého (Wigler a spol., 1978, Cell 14:725; Coraro a Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7: 603; Graham a Van der Eb, 1973, Virology 52:456). Tvoří se sraženina DNA a fosfátu vápenatého a tato sraženina se aplikuje na buňky. Některé buňky přijmou DNA a udržují ji v buňkách několik dní. Malá část těchto buněk /obvykle 10^{-4} / začle-

ní DNA do genomu. Za účelem identifikace těchto integrantů jsou obvykle zavedeny do buňky spolu se sledovanými geny, které podmiňují rozdělitelný fenotyp (selektující marker). Výhodnými rozlišujícími markery jsou geny podmiňující rezistenci proti lékům jako je neomycin, hygromycin a methotrexát. Rozlišitelné markery mohou být zavedeny do buněk na separátních plasmidech v tu samou dobu jako sledované geny nebo mohou být zavedeny na tomtéž plasmidu.

Získání množství integrované genové sekvence je možné amplifikační metodou známou v oboru, používající určitých rozlišitelných markerů (např. dihydrofolát-reduktázy, která podmiňuje rezistenci k metothrexátu). Rozlišitelný marker je zaveden do buňky spolu se sledovaným genem a je aplikována selekce lékem. Koncentrace léčiva je zvyšována stupňovitě. Selekcí pro rostoucí množství kopií klonovaných sekvencí může být znatelně zvýšená hladina exprese.

Mutantní angiogenní proteiny produkované podle předloženého vynálezu mohou být použity k produkci farmaceutických kompozic pro terapii a diagnostiku kombinací se vhodnými nosiči. Tyto farmaceutické kompozice obsahují účinné angiogenní množství proteinu a jsou rovněž v rozsahu předloženého vynálezu. Takové farmaceutické kompozice mohou být použity k povzbuzení nebo ovlivnění vývoje krevního systému u savců jako jsou kočky, psi a lidé, například k indukci kolaterálního oběhu po srdečním záchvatu nebo jiné ischemické chorobě srdeční. Pro tento účel je angiogenní protein podle předloženého vynálezu podáván parenterálně. Výraz "parenterálně", který je zde použit zahrnuje subkutánní, intravenózní, intramuskulární nebo intrasternální injekční nebo infuzní techniky. Z přijatelných vehikulí a rozpouštědel, která mohou být použita, patří například voda pro injekce, Ringerův roztok a isotonický roztok chloridu sodného. V typickém provedení je zvolený protein rozpouštěn ve vehikulu, typicky vodě pro injekce a smísen do

do parenterálních přípravků za použití známých farmaceutických postupů tak, že každá dávková jednotka obsahuje účinné angiogenní množství proteinu. Účinnou dávku je potřeba individualizovat podle požadovaných klinických efektů, kterých má být dosaženo.

K rozšíření terapeutického spektra mohou být tyto farmaceutické kompozice podávány spolu s jinými léčivými jako jsou antagonisté beta-adrenoreceptorů, například propranolol, blokátory kanálků vápníku například nifedipin nebo jiné koronární vasodilátory.

Proteiny podle předloženého vynálezu mohou být také použity k podpoření poúrazového hojení, například při spojování nebo jiných lokacích, obsahujících měkké tkáně. Například jestliže dochází často ke zraněním menisku kolena nebo ramena při sportovních zraněních nebo při osteoartritidě, je načasované zavedení terapeuticky účinného množství angiogenního proteinu výhodnou léčbou, vedoucí k uzdravení natrženého nebo traumatizovaného fibrocartilagového materiálu. Proteiny podle předloženého vynálezu mohou být rovněž zavedeny topicky na zraněné místo. Pro topickou aplikaci jsou zvolené proteiny podle předloženého vynálezu smíchány s dermatologicky přijatelným nosičem jako je petrolejový rosol, talek a podobně a volně pak aplikován na poškozené místo. Technologie regionální mutageneze s rekombinací DNA poskytuje vynikající metodu pro produkci mutantních proteinů podle předloženého vynálezu v množství potřebném pro jejich terapeutickou aplikaci.

Je dobře známo, že angiogenin a RNáza A vykazují podobnost v aminokyselinových sekvencích, trojrozměrné struktury a kapacitě štěpení RNA. Přesto není RNáza angiogenní, nevyvolává druhotnou messengerovou odpověď v endotelových buňkách (Bicknell a Vallee, 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5961-5965),

a nevykazuje selektivní štěpení rRNA v intaktních ribozomech (St.Clair a spol., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:8330-8334; St.Clair a spol., 1988, Biochemistry 27: 7263-7268). Poněvadž aktivity angiogeninu in vitro a in vivo se zřetelně odlišují od aktivity RNázy, měly by být i charakteristiky molekuly, které určují základy těchto aktivit také odlišné. K identifikaci takových rysů byly analyzovány v přírodě se vyskytující variace sekvencí angiogeninu z různých druhů a byly popsány v příkladu 1. Oblasti angiogeninu, které jsou rozhodující pro tuto jedinečnou aktivitu i) byly uchovány v druzích a ii) měly by být odlišné od odpovídajících oblastí RNázy. Jestli takové oblasti mohou být identifikovány v souladu s příkladem 1, jejich skutečná úloha může být vyzkoušena regionální mutagenezí jak je popsáno v příkladu 2.

Podobné diagramy byly konstruovány srovnáním sekvencí lidského angiogeninu s těmito sekvencemi hovězího angiogeninu (obr.1a) a týmiž sekvencemi hovězí pankreatické RNázy (obr. 1b). Rozdíl mezi dvěma diagramy, 1a minus 1b, byl pak vypočítán za účelem porovnání těchto oblastí lidského angiogeninu jak s vysoce shodným hovězím angiogeninem tak s málo shodnou RNázou (obr.1c). Podle těchto analýz jeden segment je mimo; je to segment umístěný při zbytcích 16-19. Poněvadž analýza použila pětizbytkové "okénko", jsou skutečně obsažené aminokyseliny Tyr-14 až Arg-21. Ve trojrozměrné struktuře tyto zbytky (s výjimkou Tyr-14) by měly být v prodloužené konformaci rozprostírající se od aktivního místa, vztaženo na srovnání s RNázou (obr.9). Další prozkoumání těchto aminokyselinových sekvencí (obr.2a) potvrdilo, že šest z osmi zbytků v této sekvenci je uchováno do určité míry v sekvencích savčího angiogeninu. Jenom jeden z těchto 8 zbytků, Asp-15, je také přítomen v RNáze A. Zatímco tyto sekvence jsou vysoce zachovány v angiogeninech, odpovídající sekvence v paren-terální RNáze jsou velmi slabě zachovány v druzích (obr.2a). Ve skutečnosti, Hofman a spol., 1966, J. Amer.Chem.Soc.88:3633-

3639, se ukázalo, že zbytky 15-20 nejsou kompletně nezbytné pro aktivitu RNázy A.

Bezprostředně zbytkům 14-21 angiogeninu předchází blok aminokyselin His8 až His13, který je uchován ve čtyřech savčích angiogeninech (obr.2a). Zbytky 8-13 formují část α -helixu, která začíná na Ser-4 a má stejnou strukturu jako RNáza-A. (obr.9). Dva zbytky, His8 a Thr11 nahrazují aminokyseliny uchovávané ve 39 savčích pankreatických RNázách a kyselý Glu9 RNázy je nahrazen hydrofobním leucinem. Proto tyto zbytky od His8 do His13 také ukazují možné výrazné rozdíly od RNázy A. Proto, aby byla objasněna funkční úloha této celé sekce angiogeninu, zbytky 8 až 21 byly zkoumány společně se zbytkem 22 (aby byla udržena originální vsádka proteinu) pomocí regionální mutagenese.

Regionální mutagenese se liší od místně řízené mutagenese v tom, že segmenty nebo oblasti aminokyselin jsou nahrazeny více než jedním zbytkem. Toto umožňuje testování mnohonásobných zbytků jednotlivě a také, dovoluje přispět ke zkoumání sekundární struktury. Protože/podobnost prostorové struktury mezi angiogeninem a RNázou, při výměně oblastí z jednoho proteinu do druhého, může být celková konformace zachována. Účinnost tohoto přiblížení byla demonstrována dříve, kdy byly zbytku 58-70 angiogeninu nahrazeny RNázovými A zbytky 59-73 (Harper a Vallee, 1989, Biochemistry 28:1875-1884). Výsledný mutantní hybridní protein, označený ARH-I, složený do přesné konformace, formuje nejen 3 disulfidické vazby nalezené v angiogeninu, ale i čtyři disulfidické vazby z RNázy A. Tak N-terminální oblast angiogeninu může také být přístupna přemístění za zachování celkové konformace, částečně ve světle skutečnosti, že peptid Ang(1-21), obsahující aminokyselinové zbytky 1-21 angiogeninu, může být takový, že netvoří kovalentní vazbu na peptid RNázy (21-124), obsahující aminokyselinové zbytky 21-124 RNázy s mikromolární disociační konstantou, rekonstituující 50 % enzymatické aktivity RNázy A (Har-

per a spol., 1988, Biochemistry 27: 219-226). To demonstruje, že zde je strukturní podobnost mezi dvěma proteiny v této oblasti. Amino-koncová oblast RNázy A byla subjektem usilovných krystalografických a chemických studií, náležitě dlouho zpracovávána systémem S-peptid/S-protein. Termín S-peptid se vztahuje k peptidu RNázy, obsahujícímu zbytky 1-20, získanému limitovanou proteolýzou RNázy A. Zbytek molekuly, obsahující zbytky 21-124, je označen jako S-protein (Richard a Vithayathil, 1959, J.Bio.Chem. 234:162-166). Obr.9 představuje diagram RNázy A s vyznačenými pozicemi základních aktivních míst zbytků His-12, Lys-41 a His-119. Také jsou zvýrazněny Lys-7 a Ser-21. Jak ukazuje obr.9, zbytky 3-13 RNázy A formuje α -helix, která je ohraničena rozvírajícím místem a obsahuje katalytický His12 a substrát vázající Gln-11 zbytky; Helix se váže nekovalentně na S-proteinovou část molekuly se submikromolární disociační konstantou (Richards a Wyckoff, 1971, Enzymes (3.vyd.) 4:647-806 a v něm uvedené odkazy). Zbytky 15-23 se pak rozprostírají ven z molekuly pryč od aktivních míst a vytvářejí spojení se druhou α -helix. Mnohým z těchto zbytků byla přidělena specifická funkce (shrnuje Richardsem a Wyckoffem, 1971, supra; Richards a Wyckoff, 1973, Atlas of Molecular Structures in Biology (Phillips, D.C. a Richards, F.M., Eds.) Vol.1, Oxford University Press, Londýn; Blackburn a Moore, 1982, Enzymes (3.vyd.) 15:317-433; Wlodawer a spol., J. Biol.Chem. 257:1325-1335), zahrnující Glu-2 (vzby vodíkové vedlejšího řetězce (H-vazby) k Arg-10), Phe-8 (hydrofobní interakce s proteinem jádra), Arg-10 (H-vazby vedlejšího řetězce ke Glu-2), Gln-11 (H-vazby vedlejšího řetězce k fosfátovému substrátu; řetězec karbonyl H-vazeb k Asn-44), His-12 (vedlejší řetězec zahrnutý v katalýze; H-vazby ke karbonylu Thr-43), Met-13 (hydrofobní interakce s proteinem jádra) a Asp-14 (vedlejší řetězec H-vazeb k Tyr-25 a/nebo Arg-33). Důležitost těchto zbytků se odrazí v tom, že s výjimkou Met-13 jsou všechny uchovány v pankreatické RNáze ze 39 savčích druhů (Beintema a spol., 1986, Mo.Biol.Evol. 3:262-275). Oproti tomu žádný ze zbytků 15 - 23 není uchován mezi těmito rozdílnými RNázami a, jak bylo uvedeno výše, zbytky 15-20 nejsou celkově podstatné.

Koncová amino-oblast angiogeninu, ve srovnání s výše uvedeným, tak usilovně studována. Nakonec byly aminokyselinové sekvenční analýzy angiogeninu z několika druhů zkompletovány. Sekvence N-koncové oblasti angiogeninu jsou znázorněny na obr 2a; zbytky, uchované ve čtyřech různých druzích jsou zarámovány. Sekvenční analýzy angiogeninu z těchto rozdílných druhů odhalily, že 16 z prvních 21 zbytků angiogeninu jsou konstantní a 12 ze 16 se liší od jejich odpovídajících zbytků v RNáze A. Několik aminokyselin, které jsou uchovány ve všech pankreatických RNázách, je přemístěno do angiogeninu; jsou to Glu-2, Ala-5-Lys-7 a Arg-10. Vztaheno na srovnání se strukturou RNázy A, zbytky 4-14 angiogeninu by měly tvořit α -helix s vedlejšími řetězci Gln-12 a His-13 vedenými do aktivních míst štěpení. Zbytky 15 až 24 mohou být nataženy v relativně neuspořádané konfiguraci směrem k "zadní straně" molekuly, před několika řetězci β -listu, pro spojení s druhou α -helix. Oblast vybraná pro mutaci podle předloženého vynálezu zahrnuje zbytky 8-22 angiogeninu a odpovídá sekvenci RNázy. Rozpětí zbytků Lys-7 až Ser-21 je zvýrazněno na obr.9. Konstrukce DNA kodující sekvence pro tento genovým inženýrstvím sestrojený hybridní protein, označený ARH-III, je popsána v příkladu 2. Kodující sekvence pro ARH-III je exprimována v E.coli hostitelských buňkách a ARH-III protein byl čištěn jak je popsáno v příkladu 3. Kodující sekvence pro ARH-III může být také exprimována v jiných než bakteriálních hostitelských buňkách, jako jsou kvasinky nebo savčí buňky, jak je popsáno výše. Aminokyselinová analýza a analýza tryptických peptidů (příklad 4) vyčištěného ARH-III proteinu z E.coli expresního systému byla v souladu s úspěšnou náhradou zbytků 8-22 angiogeninu zbytky 7-21 RNázy A, stejně jako s přemístěním Met-(-1) z proteinu exprimovaného v E.coli.

Regionální mutace má malý vliv na aktivitu hybridního proteinu ARH-III směrem k většině RNA substrátů jak je popsáno v příkladu 5. Při pH 6,8 ARH-III štěpí tRNA stejně rychle

jako angiogenin (obr.5a), ačkoliv je zde nevelký posun v optimu pH (obr.5b). Rychlosti štěpení izolovaných 18S a 28S rRNA jakož i dinukleotidových RNA substrátů (získaných od Sigma Chemical Co nebo Calbiochem-Behring) cytidylyl-(3'-5')-adenosinu (CpA), cytidylyl-(3'-5')guanosinu (CpG), uridylyl-(3'-5')adenosinu (UpA) a uridylyl-(3'-5')guanosinu (UpG) (Tabulka II) jsou také v podstatě stejné jako pro angiogenin. V souladu s tím u nahrazované oblasti nevyšlo najévo, že by hrála významnou roli v této aktivitě angiogeninu. Navíc tyto výsledky naznačují, že relativní rozdíly v dinukleotidovém výběru, které existují mezi RNázou a angiogeninem (Shapiro a spol., 1988, Anal.Biochem. 175:450-461; Harper a Vallee, 1989, Biochemistry 28: 1875-1884) nepocházejí z interkace substrátu a enzymu s některými z těchto zbytků. Nedostatečný efekt v obecných RNázových aktivitách nevylučuje úlohu pro ribonukleolytické štěpení v akci angiogenního mechanismu, ale dostatečně naznačuje, že takové štěpení by mělo obsáhnout specifický substrát.

Naproti tomu, jak je popsáno v příkladu 6, regionální mutace měly významný vliv na aktivity ARH-III v inhibici proteinové syntézy a angiogenezi a také ve druhé messenger-zkoušce. ARH-III byla přibližně 30krát méně aktivní než angiogenin v inhibici syntézy volných proteinů z buněk než angiogenin, účinky byly pozorovány ~~jak~~ při inkorporaci ³⁵S-methiononu do celého proteinu (tabulka III) tak v generování specifických rRNA štěpných produktů z intaktních ribozomů (obr.6). V CAM angiogenezní zkoušce, jak je popsána v příkladu 8, byl ARH-III neočekávaně více účinný než angiogenin desetkrát (obr.7). ARH-III dosáhl plné aktivity při 0,1 ng per egg tam, kde angiogenin vyžadoval obvykle 1 ng (obr.7). Stejně výsledky byly pozorovány ve druhé messengerové zkoušce s endotelovými buňkami-Dávka odpovídající křivce pro ARH-III indukující uvolnění diacylglycerolu nebo sekreci prostacyklinů byla snížena 10 až 100krát v porovnání s angiogeninem. Nedostatečná shoda mezi efektem regionální mutace na angiogenezi (10x zvyšuje

schopnost) a na inhibici syntézy proteinů (30x snižuje schopnost) naznačuje, že tyto dvě aktivity nejsou spojeny. Tyto dvě aktivity mohou reprezentovat samostatné, nezávislé funkce molekuly angiogeninu. Obráceně, shoda mezi účinkem regionální mutace na angiogenezi a na druhou messengerovou aktivitu indikuje, že tyto dvě aktivity angiogeninu mohou souviset. Pro tyto dvě aktivity (angiogenní a druhou-messengerovou) dávka odpovídá křivce pro ARH-III při koncentracích 10- až 100krát nižších ve srovnání s angiogeninem. Tato data podporují hypotézu, že spojení mezi těmito dvěma aktivitami může být obsaženo v aktivaci domnělého receptoru angiogeninu.

Jak je popsáno v příkladu 8, ARH-III vykazuje o jeden řád vyšší vazací schopnost k PRI ve srovnání s angiogeninem. PRI je těsně vazebný inhibitor angiogeninu a RNázy. Tento 50 kDa protein se váže na angiogenin s K_d 0,7 fM (Lee a spol., 1989b, Biochemistry 28: 225-230). Interakce minimálně obsáhne aktivní místa a zruší oblast okolo Trp-89 (Lee a spol., 1989a, Biochemistry 28: 219-224, Lee a Vallee, 1989a, Biochemistry 28:3556-3561). Interakce PRI s RNázou, která je 60krát slabší než s angiogeninem (Lee a spol., 1989b, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:121-126), je uváděna, že probíhá pouze na S-proteinové části molekuly, s nevýznamným přispěním ze zbytků 1-20 (Blackburn a Jailkhani, 1979, J. Biol. Chem. 254:12488-12493). Je proto překvapující, že regionální mutace angiogeninových zbytků 8-22, v souladu s předloženým vynálezem, aktuálně zvyšuje afinitu ARH-III k PRI jak je uvedeno v tabulce V. Rychlost asociace je více než dvojnásobná a disociační rychlost byla snížena až k mezi detekce, tj. nejméně čtyřikrát. K_d je tedy nejméně řádově nižší než pro angiogenin. Tato změna je neočekávaná z hlediska zvýšení angiogenní aktivity a aktivity buněčné odezvy ARH-III při nižší koncentraci.

V předkládaném vynálezu zůstávajícím se výzkumem mutagenese, vyvstává otázka, jak správně složit mutantní protein.

Důkazy pro nezkreslené konformace pro ARH-III regionální mutant jsou tři: 1) všechny tři disulfidické vazby jsou správně vytvořeny, což vyžaduje přesné zařazení šesti cysteinových zbytků z různé lokalizace do sekvence, 2) rychlosti hydrolýzy čtyř dinukleotidů a jiných RNA substrátů jsou nezměněny regionální mutací což znamená, že pozice různých zbytků řízeně zapojených do rozštěpené fosfordiesterové vazby, nebyly porušeny, a 3) ARH-III se extrémně těsně váže na PRI, tato interakce znovu potřebuje přesné rozmístění multiplikovaných zbytků, které jsou zapojeny do vazby a nízká hodnota K_i ($\leq 7 \times 10^{-17}$ M) je neslučitelná s jakoukoliv velkou změnou v konformaci.

Výsledky popsané v příkladech, které následují, ukazují, že charakteristické aktivity angiogeninu/RNázového hybridního proteinu ARH-III podle předloženého vynálezu byly výrazně ovlivněny regionální mutagenézí, která je zde popsána. Vynález je ilustrován následujícími příklady, které jsou míněny jako přiblížení vynálezu a v žádném případě nikterak neomezuje rozsah předloženého vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Selekce oblastí pro mutagenézi

Podobné diagramy byly vypočteny pro poskytnutí kvantitativního srovnání sekvencí lidského angiogeninu se sekvencemi hovězího angiogeninu (obr.1A) a RNázy A (obr.1b). Diagramy ukazují procentuální shodu mezi dvěma proteiny s pohyblivým pětizbytkovým okénkem umístěným při zbytku lidského angiogeninu. Toto bylo dosaženo použitím počítačového programu se svolením dr.D.J.Strydoma, Harvard Medical School. Aby se usnadnilo seřazení sekvencí, byl deletován N-koncový alalin hovězího angiogeninu jako i RNázové zbytky Asn-24, Arg-39,

Gln-69, Thr-70, Pro-114 a Tyr-115 (číslování RNázy A). Protože hodnoty byly odhadovány nad 5 zbytků, zdůrazňují/regionální trendy spíše, než podobnosti/rozdíly v jednotlivých místech.

První graf srovnává sekvence lidského angiogeninu se sekvencemi hovězího angiogeninu (Obr.1a). Ve většině případů byla shoda 60 % nebo větší v soulase s celkovou shodou 64 % (Mass a spol., 1988, FEBS Lett., 241: 41-45; Bond a Strydom, 1989, Biochemistry 28: 6110-6113). Není překvapující, že oblasti okolo tří zásadních katalytických zbytků angiogeninu, His-13, Lys-40 a His-114, byly mezi proteiny velmi podobné; fakticky se vyskytují tři nejdelší segmenty 80% nebo vyšší shody na pozicích 7-19, 37-48 a 106-114. Pět rozdílných oblastí vykazuje 100% shodu a nejdelší z nich je segment z pozic 10-16.

Obr.1b porovnává lidský angiogenin s RNázou. Stupeň podobnosti byl o mnoho nižší než uvedený výše, sestával se ze 33 % podobnosti celého řetězce. V tomto případě to je skutečná rozdílnost mezi těmito dvěma sekvencemi, z které je nejzajímavější, protože mohou tvořit základ pro rozdílné biologické úlohy proteinů. Krátké oblasti nejmenší podobnosti (0 % shody) se vyskytují na pozicích 4-6, 50-52, 64-65 a 100-102, nejdelší oblast je 18-22.

Obr.1c ukazuje rozdíl mezi dvěma předcházejícími obrázky, odečítá hodnoty z obr.1b od odpovídajících hodnot z obr. 1a. Vysoké hodnoty z obr.1c indikují oblasti lidského angiogeninu jak s vysokou shodou s hovězím angiogeninem tak s nízkou shodou s RNázou. Tyto oblasti nejpravděpodobněji obsahují unikátní úlohu pro angiogenin. Jenom čtyři samostatná okénka dosahují 80% rozdíl ve shodě a tři z nich se vyskytují v těsné blízkosti poloh 16, 18 a 19. Tyto krátké segmenty tak stojí mimo jako nejuchovanější v angiogeninech a jako nejrozdílnější k RNáze. Zbytky obsažené v tomto segmentu ve dvou

koncových okénkách, jsou Tyr-14 až Arg-21.

Obrázek 2a představuje N-terminální sekvenci RN-ázy A a lidského angiogeninu. Zbytky v RNáze A zachovávané v pankreatické RNáze ze 39 savčích druhů (Beintema a spol., 1986, Mol. Biol. Evo. 3: 262-275) jsou označeny hvězdičkou. Oramované zbytky angiogeninu jsou zachované v lidském hovězí (Bond a Strydom, 1989, Biochemistry 28: 6110-6113; Maes a spol., 1988, FEBS Lett. 241:41-45), vepřových proteinech a proteinech králík. $\angle Q$ je pyroglutamová kyselina. Obr.2a ukazuje, že bezprostředně předcházející zbytkům 14-21 angiogeninu je blok aminokyselin od His-8 do His-13, který je uchován ve čtyřech savčích angiogeninech, tyto zbytky formují část α -helixu začínající na Ser-4, předpokládáme-li stejnou strukturu jako má RNáza, jak je uvedena na obr.9. Dva zbytky His-8 a Thr-11, nahrazují aminokyseliny uchované ve 39 savčích pankreatických RNázách a kyselina Glu-9 RNázy je nahrazena leucinem. Proto tyto zbytky také ukazují možné signifikantní rozdíly od RNázy A. V souladu s tím, aby byla objasněna celá sekce angiogeninu, byly zbytky 8 až 21 zkoumány spolu se zbytkem 22 (s cílem udržení čisté vsádky proteinu) pomocí prostředků regionální mutageneze.

Příklad 2

Konstrukce ARH-III kodující sekvence

Celá sekce angiogeninu vybraná pro mutagenezi podle příkladu 1 se rozkládá od His-8 do Asp-22. Tyto zbytky byly nahrazeny zbytky 7-21 RNázy A (obr.2a). Kodující DNA sekvence pro tento hybridní protein, označený ARH-III (obr.2a,b) byla zkonstruována, jak ukazuje obr.3, následovně. Fragmenty A a C byly generovány štěpením pAng2 DNA (13 μ g) buď XhoI a EcoRI nebo PvuI a EcoRI s následujícím čištěním elektroforézou ve 3% gelu za použití NuSieve GTG agarózy s nízkým bodem tání (získané od FMC BioProducts). DNA z expresního plasmidu

pAng2 byla získána jak je popsáno Shapirem a spol., 1988, Anal.Biochem.175:450-461 a v US patentové přihlášce č. 305968, které jsou zde citovány jako odkazy. Plasmid pAng2 obsahuje modifikovaný Trp promotor a ampicilínový marker pro selekci. Fragment A (2928 bp), obsahující celý nekodující region plasmidu a kodující oblast pro Met-(-1) až do Asn-3, fragment C se sestává z kodující oblasti od Arg-24 do Pro-123 a dvou stop kodonů. Fragmenty A a C byly pak spojeny s fragmentem B, syntetickým a dvojřetězcovým oligonukleotidem, kodujícím zbytky 4-7 angiogeninu, 7-21 RNázy a 23 angiogeninu jak je znázorněno na obr.2b. Konce syntetického dvouřetězcového oligonukleotidu jsou kompatibilní pro ligaci s místy rozštěpenými restriktčními enzymy XhoI a PvuI. Tento syntetický dvojřetězcový oligonukleotid byl získán z Biopolymer Laboratory, Dept. of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School. Každý řetězec byl syntetizován souhlasně s konvenčními metodami využívajícími β -kyanoethylfosforamiditovou automatizovanou syntézu za užití Milligen Syntetizéru (Matteucci a Caruthers, 1981, J.Amer.Chem.Soc. 103: 3185-3191; Beaucage a Caruthers, 1981, Tet.Letters 22: 1859-1862). Duplex byl získán připojením 5' fosforylovaných komplementárních oligomerů jak popisuje Harper a Vallee, 1989, Biochemistry 28:1875-1884. Nejúspěšnější spojovací reakce použila 24, 150 a 100 pmol fragmentů A, B a C a 6 jednotek T4 DNA ligázy v 60 μ l objemu; finální agarozová koncentrace byla 1,4 %. Buňky kmene E.coli W3110 byly pak transformovány za použití CaCl₂ postupu (Maniatis a spol., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) a plasmidy byly detegovány rezistencí k ampicilinu.

Jak mapování restriktčními enzymy (HaeIII nebo EcoRI a KpnI) tak nukleotidová sekvenční analýza byly použity pro zjištění tohoto nového genetickým inženýrstvím vyrobeného plasmidu, označeného pARH-III, obsahujícího správnou kodující sekvenci. Sekvenování DNA bylo provedeno se soupravou SequenaseTM (U.S.Biochemical Corp.) se ³⁵S/-deoxyadenosin-5'-(α -thio)-

trifosfátem. Pro sekvenování byl KpnI-EcoRI fragment, obsahující kodující oblast izolován a klonován do M13mp18 za použití běžných metod. Nukleotidová sekvence, odpovídající prvním 60 aminokyselinám proteinu byla předpokládána pro hybridní protein. Plasmid pARH-III byl deponován v American Type Culture Collection (A.T.C.C.) pod číslem 68188.

Příklad 3

Exprese a čištění angiogeninu a ARH-III

A. Angiogenin

Exprese v bakteriálních buňkách a čištění angiogeninu ve velkém měřítku byly provedeny jak je detailně popsáno Shapiro a spol., 1988, Anal. Biochem., 175_450-461. Buňky E.coli W3110, obsahující pAng2 byly kultivovány v doplněném M9 mediu a pak indukovány přidavkem kyseliny indol-3-akrylové. Buňky pak byly odděleny odstředěním, suspendovány v lysozymu, NaCl, EDTA roztoku po 45 minut a pak zpracovány ultrazvukem. Nerozpustný angiogenin byl získán odstředěním, rozpuštěn ve guanidin.HCl a 2-merkapt ethanolu a pak převeden rozpuštěním do Tris-NaCl pufru. Po zahuštění ve tlakové filtrační jednotce Amicon (Danvers, MA 01923), byl angiogenin čištěn následující aplikací na HPLC kolony s Mono S a C18 reverzní fází. Navíc byl angiogenin získán z genetickým inženýrstvím zpracovaných buněk ledvin mladých křečků (BHK) jak je detailně popsáno Kurachim a spol., 1988, Biochemistry 27: 6557-62. Transfektované buňky se kultivují při 37 °C v DME mediu, obsahujícím 80 μ M ZnSO₄ a 2 μ M CdSO₄, které bylo měněno ve 2-3 denních intervalech. Angiogenin byl pak čištěn od media postupnou chromatografií na kolonách iontovýměnné CM-celulozy a Mono S. Pokud není uvedeno jinak, angiogenin použitý v následujících příkladech byl získán z buněk BHK jak je uvedeno.

B. ARH-III

Hladiny expresí 9 individuálních kolonií *E.coli* W3110 transformovaných pARH-III jak je popsáno v příkladu 2, byly odhadnuty imunoblottingem za použití afinitně čištěného anti-angiogeninu jak je popsáno Shapiрем a spol., 1988, supra. Buňky, vykazující nejvyšší hladinu exprese (~ 10 mg/l) byly selektovány pro ARH-III expresi.

Výrazná exprese a čištění bylo provedeno jak je popsáno dříve pro angiogenin Shapiрем a spol., 1988 supra. Hybridní ARH-III protein byl tak exprimován v *E.coli* W3110, získán a čištěn za použití Mono S kationtové výměny a C18 (oktadecylsilan) reverzní fázové HPLC jak je popsáno Shapiрем a spol., 1988, supra. SEP-PAK C18 náplně byly od Milipore Corp. (Bedford, MA 01730). ARH-III hybridní protein byl eluován dříve než angiogenin na koloně Mono S (8 minut rozdílu v retenční době, 50 minutový gradient z 0,15 na 0,55 M NaCl v 10 mM Tris, pH 8,0). Eluuje se jako ostrý, symetrický pík na C18 koloně s malým hrbem, zahrnujícím 5 % celkové plochy. Střední frakce hlavního píku byly spojeny a dialyzovány a SDS-PAGE analýza prokázala jediný kompaktní pruh při $M_r \sim 14,500$. Celkový výtěžek byl 0,4 mg/l kultury.

Úbytek Met-(-1) hybridního proteinu ARH-III, exprimovaného v *E.coli* ($9 \mu\text{M}$) byl enzymaticky odstraněn *Aeromonas* aminopeptidázou jak je popsáno Shapiрем a spol., 1988, supra, za podmínek vhodných pro spontánní cyklizaci dalšího zbytku, Gln-1, na pyroglutamovou kyselinu. Protein byl pak čištěn HPLC s reverzní fází jak je uvedeno výše a frakce píku byly spojeny a dialyzovány proti vodě.

Ačkoliv jakýkoliv přírodní (nemutovaný) nebo mutantní (mutovaný) angiogenin exprimovaný v *E.coli* za použití pAng2

obsahuje Met-(-1) v amino-konci nebyla dosud pro tento zbytek nalezena účinná enzymatická nebo angiogenní aktivita. Nicméně, vzhledem k jeho blízkosti k přemístěné oblasti v ARH-III, byl N-terminální Met-(-1) zbytek odstraněn jak je popsáno výše k zajištění toho, že vazba a orientace nové oblasti bude přibližně taková, jak je to v angiogeninu, jak je to jen možné. Aminokyselinové složení a peptidové mapování naznačují, že odstranění Met-(-1) v ARH-III bylo větší než 95 % jak je popsáno v příkladu 4 dále.

Příklad 4

Strukturní charakteristika ARH-III

Aminokyselinová analýza byla provedena jak je popsáno dříve (Strydom a spol., 1985, Biochemistry 24: 5486-5494) za použití derivatizační metody Picotag a HPLC systému Waters Associates (Milford, MA 01757). Digesce trypsinem byla provedena inkubací 4,1 nmol ARH-III s 95 pmol HPLC čištěným trypsinem v 730 μ l 20 mM Tris, 0,35 M NaCl, pH 8,0 po dobu 24 hodin při 37 °C. Peptidy byly odděleny HPLC s reverzní fází jak je popsáno Shapirem a spol., 1988 supra, a identifikovány eluční polohou a složením aminokyselin. Byla použita Altex ultrasférová IP C18 kolona s lineárním gradientem 0-50 % rozpouštědla B (3:2:2, 2-propanol-acetonitril:0.08% vodná trifluoroctová kyselina (TFA) v rozpouštědle A (0,1% TFA) během 140 minut. Průtoková rychlost kolony byla 0,8 ml/minuta.

SDS-PAGE byla provedena na 15% polyakryamidových gelech s 5% vrstvených gelů jak je popsáno Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685. Proteiny byly vizualizovány za použití rychlé vyvolávací soupravy obsahující stříbro od ICN Immunobiologicals (Lisle, IL, 60532).

Aminokyselinové složení ARH-III jak je uvedeno v tabulce I obsahovala úspěšné nahrazení zbytků 8-22 angiogeninu

zbytky 7-21 RNázy, jakož i úspěšné odstranění Met-(-1). Výsledky tryptického štěpení ARH-III také podporují úspěšné nahrazení zbytků 8-22 jak je uvedeno v tabulce I a na obr.4. Nejmenší obr.4 představuje HPLC eluční profil tryptických peptidů ARH-III. Jednotlivé peptidy byly identifikovány složením aminokyselin popsáním pro celou sekvenci. Označení peptidů pro angiogenin je od Strydoma a spol., 1985, Biochemistry 24: 5486-5494. N-terminální sekvence angiogeninu a ARH-III jsou uvedeny na obr.4; dvojhrotová šipka ukazuje peptidy generované tryptickým štěpením. Celé trojcystinové spojené peptidové páry, T-9B, T-10 a T-11, byly odstraněny, v souladu s vlastním převedením a oxidací proteinu. Peptidy T-1, -2, -3a, -3b, -4a, -5, -6, -8 a disulfidické spojení T-10 a T-11 měly složení a eluční polohu v podstatě stejné jak bylo pozorováno pro lidský angiogenin (Strydom a spol., supra; Shapiro a spol., 1988, supra). Amino-koncový peptid T-1 byl získán ve výtěžku >95 %, což opět indikuje nezbytné úplné odstranění Met-(-1).

Jak se očekávalo, jediný rozdíl mezi ARH-III a angiogeninem se vyskytuje na peptidech T-7 a T-9'. V jejich místech dává hybrid ARH-III vznik dvou nových tripeptidů (označených T-7a a T-7b) a rozšiřuje formu T-9' (označenou T-9b') jak je uvedeno na obr.4. T-7a se eluuje se třemi jinými peptidy ve dvou nebo více mírně rozdělených píkách při 44 a 45 minutách; byly identifikovány složením aminokyselin. Peptid T-7b (tabulka I) eluuje jako jednotlivý pík při 56 minutách, jak je zřejmé z obrázku 4. Nehydrolyzovaný hexapeptid tvořící T-7ab byl také získán (obr.4, tabulka I). T-9b', který je disulfidicky připojen k T-9", tvoří dvojité peptid označený T-9b, byl detegován ve dvou formách. První, spojený peptid T-9b byl eluován v podstatě čisté formě v píku po 111 minutách (obr.4, tabulka I). Druhý velký pík při 109 minutách obsahuje směs T-8, T-9b a 1 až 2 Arg zbytky. Toto je ve shodě s neúplným rozštěpením T-13 (Arg-Arg dipeptid)

z karboxylového konce T-9b', a koeluci T-9b'-13/T-9" dvojitého peptidu s T-8.

Tabulka I

Aminokyselinové složení ARH-III a jeho tryptických peptidů^a

Angiogenin		ARH-III	T-7b	T-7ab	T-9b
Asp	15	14,0 (14)	0,14		2,19 (2)
Glu	10	9,9 (10)	1,00 (1)	0,98 (1)	2,95 (3)
Ser	9	12,6 (13)	0,12		6,56 (7)
Gly	8	7,5 (7)	0,12		0,52
His	6	4,9 (5)			1,11 (1)
Arg	13	13,3 (13)	1,00 (1)	1,03 (1)	2,17 (2)
Thr	7	7,3 (7)		1,00 (1)	2,87 (3)
Ala	5	6,1 (6)			1,87 (2)
Pro	8	7,5 (7)			0,18
Tyr	4	2,7 (3)		0,95 (1)	0,86 (1)
Val	5	4,0 (5)			0,94 (1)
Met	1	2,0 (2)			1,81 (2)
Ile	7	6,5 (7)			1,03 (1)
Leu	6	5,3 (5)		0,1	0,15
Phe	5	4,9 (5)	0,90 (1)	0,90 (1)	0,98 (1)
Lys	7	7,1 (7)		1,04 (1)	1,23 (1)
Cys	6	6 (6)			2 (2)
pmol			520	450	170

^aHodnoty jsou uvedeny jako zbytky/mol; množství menší než 0,1 zbytek/mol nejsou uvedena. Počty zbytků předpokládaných pro ARH-III sekvenci jsou uvedeny v závorkách. Složení tryptického peptidu je ze 200 μ l jednotlivé kolonové frakce; pmol peptidu na 200 μ l je uvedeno dole. ARH-III Cys výsledky jsou v souladu s koelucí disulfidických spojených peptidů po tryptickém štěpení.

Příklad 5

Enzymatická zkouška a aktivita

A. Enzymatická zkouška

Aktivita vůči kvasinkové tRNA (získané od Calbiochem) byla stanovena za použití srážecí zkoušky (Shapiro a spol., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84: 2238-2241) s angiogeninem nebo ARH-III v koncentracích 18 až 430 nM. Obrázek 5a znázorňuje aktivitu angiogeninu a ARH-III měřenou vůči kvasinkové tRNA. Zkouška měří vznik kyselých rozpustných fragmentů během 2 hodin při pH 6,8 a 37 °C. Zkoušky pro pH profily byly provedeny za použití následujících pufrů s hodnotami pH při 37 °C: 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (Mes), pH 5,4, 5,8, 6,3; N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2'-ethansulfonová kyselina (Hepes) pH 6,2, 6,8, 7,3, 7,8; tris(hydroxymethyl)aminomethan (tris), pH 7,5, 8,1, 8,5; a 2-(N-cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (Ches), pH 8,8, 9,3 a 9,9. Hodnoty pH byly vypočteny z odečtů při 25 °C za použití $pK_a/^\circ C$ hodnot poskytnutých Research Organics (Cleveland, Ohio 44125). Obr.5b představuje vlivy pH na aktivity ARH-III (plné trojúhelníky), angiogenin (plné kroužky) a RNázy (plné čtverečky), vůči kvasinkové tRNA. Pro porovnání jsou aktivity normalizovány při maximu ΔA_{260} získaném pro každý protein.

Aktivita vůči dinukleotid(3',5')fosfátům byla stanovena HPLC kvantitativní metodou jak je popsáno Shapiroem a spol., 1988, Anal.Biochem. 175: 450-461; Harperem a Valleem, 1989, Biochemistry 28; 1875-1884. Reakční směs (30 μ l) obsahovala 0,1 mM substrátu, 2,8 μ M ARH-III a byla inkubována po 4 až 24 hodin při 37 °C.

Ribonukleolytická aktivita vůči 18S rRNA byla vizualizována jak je popsáno Shapiroem a spol., 1986, Biochemistry 25:

3527-3532, s rRNA z telecích jater (Pharmacia) jako substrátem.

B. Enzymatická aktivita

Enzymatické aktivity ARH-III vůči tRNA, 18S a 28S rRNA a dinukleotidovým substrátům byly velmi podobné zkouškám pro angiogenin. Ve zkoušce tRNA oba proteiny vykazují nelineární odezvu pro ΔA_{260} oproti enzymové koncentraci při pH 6,8 (37 °C) a jejich aktivity jsou nerozlišitelné při koncentracích, které byly testovány, jak je uvedeno na obr.5a. ARH-III se poněkud lišil od angiogeninu, nicméně jeho pH otimum bylo $\sim 7,3$ jak je uvedeno na obr.5b. Angiogenin a RNáza (získaná od Cooper Biochemicals) měly maximální aktivity po podmínkách zkoušky při pH $\sim 6,8$ a $\sim 8,1$, což je v souladu s předcházejícími výsledky získanými Leeem a Valleem, 1989b, Biochem. and Biophys. Res. Commun. 161: 121-126. Je známo, že angiogenin katalyzuje štěpení dinukleotidových substrátů, ale při rychlosti 5 až 6krát řádově nižší než bylo pozorováno pro RNázu A (Shapiro a spol., 1988, Anal. Biochem. 175: 450-461; Harper a Vallee, 1989, Biochemistry 28: 1875-1884). Jeho specifita je rozdílná od specifity RNázy A vzhledem ke k_{cat}/K_m hodnotám pro 4 rozdílné dinukleotidy. Aktivita ARH-III vůči těmto substrátům je velmi podobná aktivitě angiogeninu, jak je uvedeno v tabulce II. Ve všech případech hodnoty k_{cat}/K_m byly ve 30 % hodnot pozorovaných pro angiogenin a relativní specifita pro substráty byla nezměněna.

Tabulka II

Aktivita ARH-III vůči dinukleotidovým substrátům^a

$$k_{\text{cat}}/K_m (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$$

substrát	ARH-III	angiogenin ^b	RNáza A ^c
CpA	13	12	$6,0 \times 10^6$
CpG	3,4	4,0	$5,1 \times 10^5$
UpA	0,8	1,1	$4,0 \times 10^6$
UpG	0,4	0,4	$1,8 \times 10^5$

^aZkoušky s ARH-III a angiogeninem byly provedeny v 30 mM Mes, 30 mM NaCl, pH 6,0 při 37 °C.

^bHodnoty od Shapira a spol., 1988, Anal.Biochem. 175: 450-461 a Harpera a Valleea, 1989, Biochemistry 28:1875-1884.

^cHodnoty od Harpera a Valleea, 1989, supra; zkoušky provedeny spektrofotometricky ve výše uvedeném pufru při 25 °C.

Je také známo, že angiogenin štěpí nechráněnou 18S a 28S rRNA selektivním způsobem, za vzniku produktů přibližné délky 100-500 nukleotidů, které zůstávají po nějakou dobu rezistentní vůči další degradaci (Shapiro a spol., Biochemistry 25: 3527-3532). Aktivita ARH-III vůči takovým nechráněným 18S a 28S rRNA byla nerozlišitelná od aktivity angiogeninu. V čase 60 až 90 minut dva proteiny (0,67 μM) katalyzují tvorbu produktů podobné velikosti a intenzity, jak bylo zjištěno elektroforézou na agarozovém gelu.

Příklad 6

Inhibice proteinové syntézy in vitro a štěpení intaktních ribosomů

Vliv ARH-III na proteinovou translaci v lyzátu králičích retikulocytů byl stanoven modifikovaným postupem podle St. Claira a spol., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:8330-8334, jak je popsáno Harperem a Valleem, 1989, Biochemistry 28: 1875-1884. Reakční směsi obsahovaly 10-210 nM angiogeninu nebo ARH-III.

ARH-III katalyzované štěpení retikulocytové ribosomální RNA v intaktních ribosomech bylo zkoušeno za použití metody St.Claira a spol., 1987, supra, jak je popsáno Harperem a Valleem, 1989 supra.

Je známo, že angiogenin inhibuje translaci v lyzátu králičích retikulocytů katalýzou vysoce specifického štěpení 18S rRNA ve 40S ribosomální podjednotce, generující malé množství diskrétních produktů jak pozoroval St.Clair a spol., 1987, supra; St.Clair a spol., 1988, Biochemistry 27: 7263-7268. RNáza A naopak atakuje ribozomy na mnoha místech za vzniku velkého množství reakčních produktů různé velikosti. Z těchto dvou je angiogenin aktuálně účinnější při inaktivaci ribosomů, i když jeho rychlost s dalšími RNA substráty je až milionkrát pomalejší než rychlost RNázy A. Tato pozoruhodná specifita je pozorována jenom s intaktními ribosomy nebo ribosomálními podjednotkami, ale ne s izolovanou 18S nebo 28S rRNA.

ARH-III je značně méně účinný než angiogenin při inhibici syntézy proteinů v lyzátu králičích retikulocytů jak je uvedeno v tabulce III. Zatímco angiogenin inhiboval translaci proteinů úplně při koncentraci 40-70 nM, ARH-III při 210

nM vykazuje méně než 50% inhibici, i při trojnásobně dlouhé inkubační době. Při srovnání množství proteinu požadovaného pro generování stejných hladin inhibice vyplynulo, že ARH-III byl 20- až 30krát méně aktivní než angiogenin ve stejném systému zkoušek.

Tabulka III

Inhibice translace proteinu in vitro ARH-III, angiogeninem a RNázou A^a

V zorek	koncentrace (nM)	% inhibice
ARH-III	70	0
	210	16
	210 ^b	44
angiogenin	10	15
	30	86
	70	100
RNáza A	30	30
	70	99

^aZkoušky byly provedeny v systému lyzátu králičích retikulocytů. Procenta inhibice jsou vztažena na množství /³⁵S/-značeného proteinu získaného kyselým srážením; 0 % a 100 % inhibice odpovídá 61,000 cpm a 200 cpm.

^bReakční doba ARH-III se směsí lyzátu byla 45 minut místo obvyklých 15 minut.

Pro určení, zda ARH-III štěpí ribosomální RNA stejným selektivním způsobem jako angiogenin, byla izolována rRNA z výše uvedené reakční směsi lyzátu králičích retikulocytů, radioaktivně označena a analyzována elektroforézou na močovino/polyakrylamidovém gelu jak je uvedeno na obr.6. Podrobněji, lyzát králičích retikulocytů byl inkubován 15 minut

H₂O (dráhy 1 a 9), angiogeninem při 10 nM (dráha 2), 30 nM (dráha 3) a 70 nM (dráha 4), nebo ARH-III při 30 nM (dráha 5), 70 nM (dráha 6), 210 nM (dráha 7) a 210 nM se 45minutovou inkubací (dráha 8). rRNA pak byla čištěna extrakcí fenol/chloroform a vysrážena ethanolem, 5' značena za použití / γ -³²P/-ATP. zpracována elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a vizualizována autoradiografií. Vzorky ve dráhách 1-4 obr.6 byly odebrány a zpracovávány elektroforézou 5 minut před odebráním drah 5-9. ARH-III generuje v podstatě stejné štěpné produkty jako angiogenin, ale potřebuje k tomu výrazně vyšší koncentrace. 45 minut inkubace při 210 nM ARH-III poskytlo produkty se stejnou intenzitou jako byly generovány za použití 20 nM angiogeninu při 15 minutové inkubační době. To odpovídá 30násobnému rozdílu v aktivitě.

Příklad 7

Biologická aktivita

Angiogeneze byla stanovena za použití zkoušky kuřecího embrya CAM podle Knightona a spol., 1977, Br.J.Cancer 35: 347-356, jak popsal Fett a spol., 1985, Biochemistra 24: 5480-5486. Jednotlivé zkoušky používaly sady 10 - 20 vajec. Celkový počet použitých vajec byl 248 pro ARH-III, 125 pro angiogenin a 20 pro H₂O. Angiogenin byl z expresního systému E.coli popsaného v příkladu 3 a obsahoval Met-(-1) zbytek, jeho potence byla nerozlišitelná od přírodního angiogeninu, obsahujícího pyroglutamovou kyselinu při amino-konci (Shapiro a spol., 1988, Anal.Biochem. 175:450-461). Dávka vyvolávající odpověď ARH-III v CAM zkoušce byla rozdílná od angiogeninu jak je uvedeno na obr. 7. Angiogenin se typicky přibližuje maximální aktivitě v dávce asi 1 ng, indukující pozitivní odpověď u 50-60 % vajec. Jeho aktivita při 0,1 ng je obvykle

blízká 10 až 20% pozitivní základní hladině pozorované se samotnou vodou. Oproti tomu ARH-III dosahuje plnou aktivitu při 0,1 ng a vzhledem k tomu je 10krát účinnější než angiogenin. To je neočekávané, neboť RNáza samotná nemá angiogenní aktivitu a ARH-III hybrid obsahuje segment odvozený od RNázy, o kterém se předpokládá, že je unikátní oblastí angiogenní struktury a funkce. Při vyšších dávkách ARH-III vyvolává maximální odezvu pozitivní ze 41 %, která je mírnější než u angiogeninu.

Příklad 8

Vazba ARH-III na PRI

Zdělnivá asociační konstanta druhého řádu, k_a , pro vazbu ARH-III k PRI byla stanovena zkouškami kompetitivnosti mezi ARH-III a RNázou k PRI jak je popsáno Leeem a Valleem, 1989a, Biochemistry 28: 3556-3561 a Leeem a spol., 1989a, Biochemistry 28: 219-224. PRI byl čištěn jak je popsáno Blackburnem, 1979, J.Biol.Chem. 254:12484-12487. Interakce byla monitorována v 0,1 M Mes, 0,1 M NaCl, 1mM EDTA, pH 6,0 při 25 °C. Hodnota k_a získaná pro ARH-III byla průměrem ze sedmi samostatných pokusů. K_a stanovená pro asociaci ARH-III a PRI byla $(4,3 \pm 0,5) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tato hodnota byla více než dvakrát větší než hodnota pro angiogenin jak je zřejmé z tabulky IV.

Konstanta disociační rychlosti, k_d , byla stanovena monitorováním uvolňování ARH-III z komplexu protein:inhibitor jako funkce času za přítomnosti přebytku lapače volného PRI jak popsali Lee a Vallee, 1989a, supra, a Lee a spol., 1989b, Biochemistry 28: 225-230. Volný angiogenin a ARH-III byly měřeny kationtovýměnnou HPLC během 10 dnů. Inkubace byla prováděna při 25 °C ve výše uvedeném pufru, obsahujícím 120 μM DTT. Disociační rychlost pro ARH-III:PRI komplex byla v podstatě nižší než pro angiogenin jak je uvedeno v tabulce IV. Obr.8 také představuje disociaci angiogeninu a ARH-III z komplexu pro-

tein:PRI v průběhu 10 dnů. osa y obr. 8 představuje frakci angiogeninu nebo ARH-III, která není vázána. Po 10denním období, během kterého se disociovali $\sim 8\%$ komplexu angiogenin:PRI, nebyla detegovatelná ($< 2\%$) ARH-III:PRI komplexu. Horní hranice pro k_d pro ARH-III může být pro k_d pro ARH-III uchovávána při $3 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$.

K_i pro interakci ARH-III a PRI, vypočtená z k_a a k_d hodnot a byla $\leq 7 \times 10^{-17} \text{ M}$. Byla nejméně 10- a 600-krát nižší než hodnoty pro angiogenin a RNázu A.

Tabulka IV

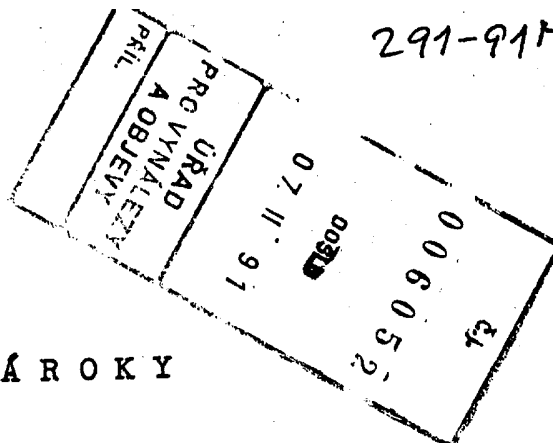
Vazebné konstanty pro ARH-III s PRI^a

Vzorek	k_a ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 10^{-8}$)	k_d ($\text{s}^{-1} \times 10^7$)	K_i (fM)
ARH-III	4,3	$\leq 0,3$	$\leq 0,07$
angiogenin ^b	1,8	1,3	0,7
RNáza A ^b	3,4	150	40

^aPodmínky inkubace byly 0,1 M Mes, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,0, 25 °C.

^bOd Leea a spol., 1989b, Biochemistry 28: 225-230.

Z předcházejícího je zřejmé, že byla popsána specifická provedení vynálezu, která však slouží pouze jako jeho ilustrace, mohou být uskutečněny různé změny v provedení, aniž by došlo k porušení rozsahu vynálezu. Podle toho není vynález nikterak omezen jinak, než předloženými nároky.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mutantní angiogenní protein, ve kterém aminokyseliny v oblasti při nebo odpovídající angiogeninovým zbytkům 8-22, byly nahrazeny jinými aminokyselinami, mající zvýšenou angiogenní aktivitu.
2. Mutantní angiogenní protein podle nároku 1, ve kterém oblast při nebo odpovídající angiogeninovým zbytkům 8-22 byla nahrazena oblastí aminokyselin v RNáze.
3. Mutantní angiogenní protein podle nároku 2, kde odpovídající oblast aminokyselin v RNáze zahrnuje aminokyseliny při nebo odpovídající zbytkům 7-21 RNázy.
4. Čištěná izolovaná DNA sekvence obsahující DNA sekvenci kodující protein podle nároku 1.
5. Čištěná izolovaná DNA sekvence obsahující DNA sekvenci kodující protein podle nároku 2.
6. Čištěná izolovaná DNA sekvence obsahující DNA sekvenci kodující protein podle bodu 3.
7. Izolovaný vektor pro expresi proteinu podle nároku 1 v transformovaných hostitelských buňkách.
8. Izolovaný vektor pro expresi proteinu podle nároku 2 v transformovaných hostitelských buňkách.
9. Izolovaný vektor pro expresi proteinu podle nároku 3 v transformovaných hostitelských buňkách.

10. Hostitelská buňka transformovaná vektorem podle nároku 7.
11. Hostitelská buňka transformovaná vektorem podle nároku 8.
12. Hostitelská buňka transformovaná vektorem podle nároku 9.
13. Farmaceutický přípravek, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje angiogenně účinné množství proteinu podle nároku 1 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
14. Farmaceutický přípravek, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje angiogenně účinné množství proteinu podle nároku 2 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
15. Farmaceutický přípravek, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje angiogenně účinné množství proteinu podle nároku 3 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.

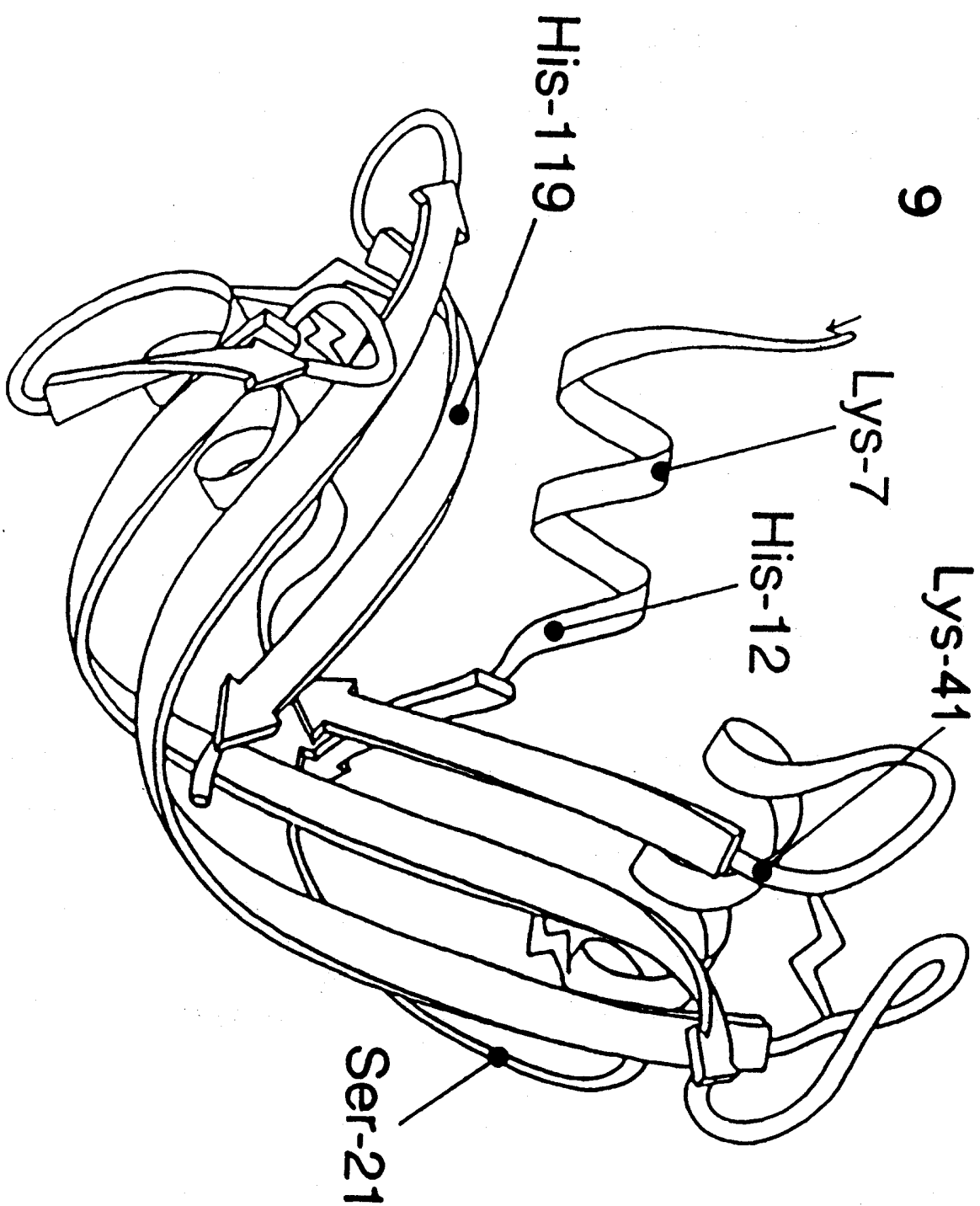
Anotace

Název vynálezu: Kovalentní hybridy angiogenin/RNáza

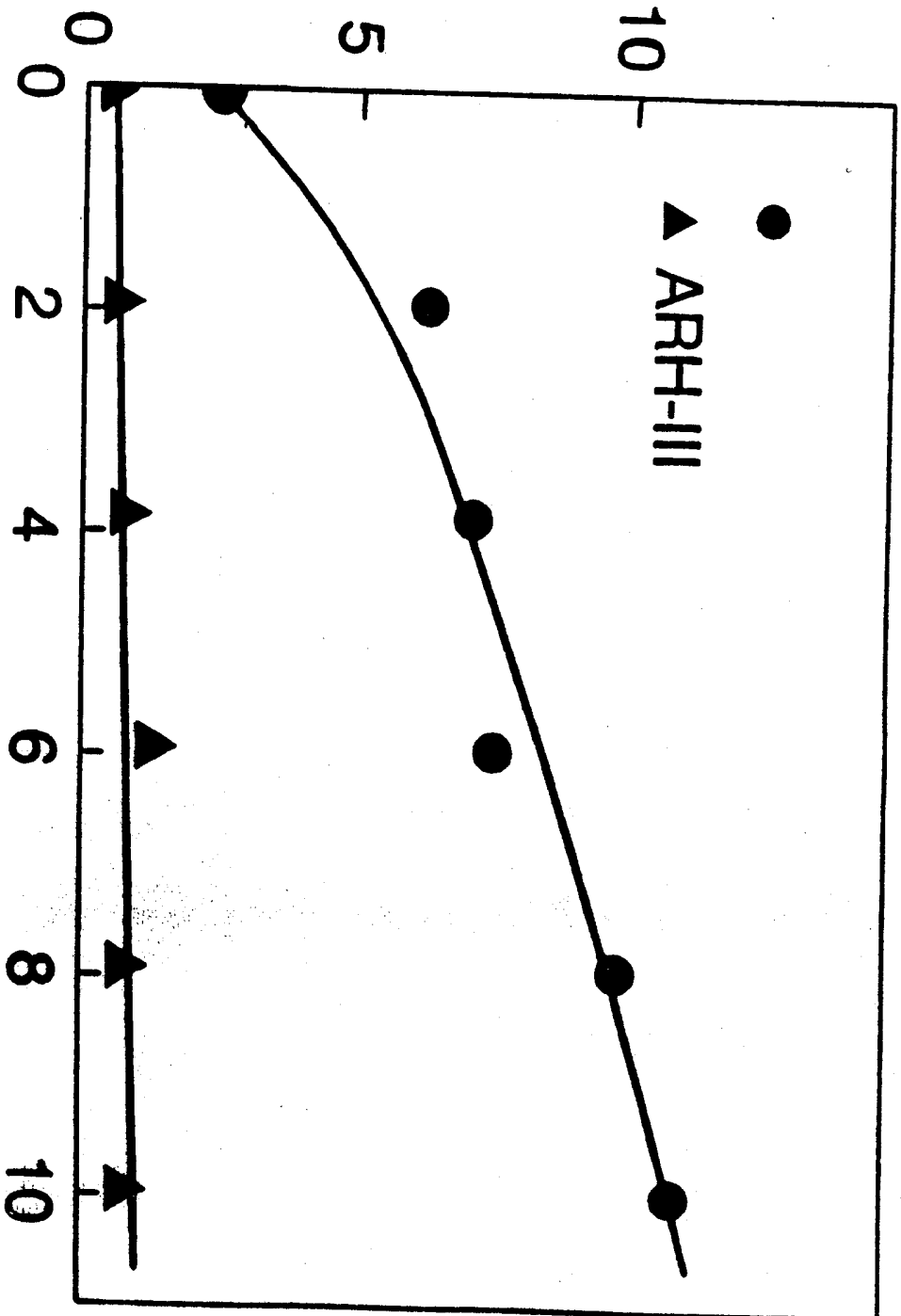
Je popisována regionální mutageneze genu pro angiogenin pro přípravu DNA sekvencí kodujících mutantní proteiny, mající zvýšenou angiogenní aktivitu. Vektory pro expresi obsahující tyto sekvence jsou zaváděny do hostitelské buňky a a řídí produkci mutantních angiogenních proteinů s výrazně zvýšenou angiogenní aktivitou. Přemístění aminokyselin v oblasti při nebo odpovídajících zbytkům 8-22 angiogeninu s dalšími aminokyselinami, zejména s aminokyselinami odpovídajícími zbytkům 7-21 RNázy, neočekávaně vede k hybridnímu proteinu angiogenin/RNáza, který je mutantní, a má 10krát vyšší angiogenní účinnost ve zkoušce chorioallantoinové membrány. Další in vivo a in vitro angiogeninové aktivity jsou v mutantním hybridním proteinu změněny. Mutantní angiogenin/RNázové hybridní proteiny podle předloženého vynálezu jsou vhodnými terapeutickými kompozicemi k promotování vývoje hemovaskulárního řečiště u savců nebo při promotování hojení poranění, zejména, hojení roztrženého nebo traumatizovaného chrupavčitého materiálu.

Číslo	006052
Datum	07. 11. 91
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PŘÍL.

Kučer

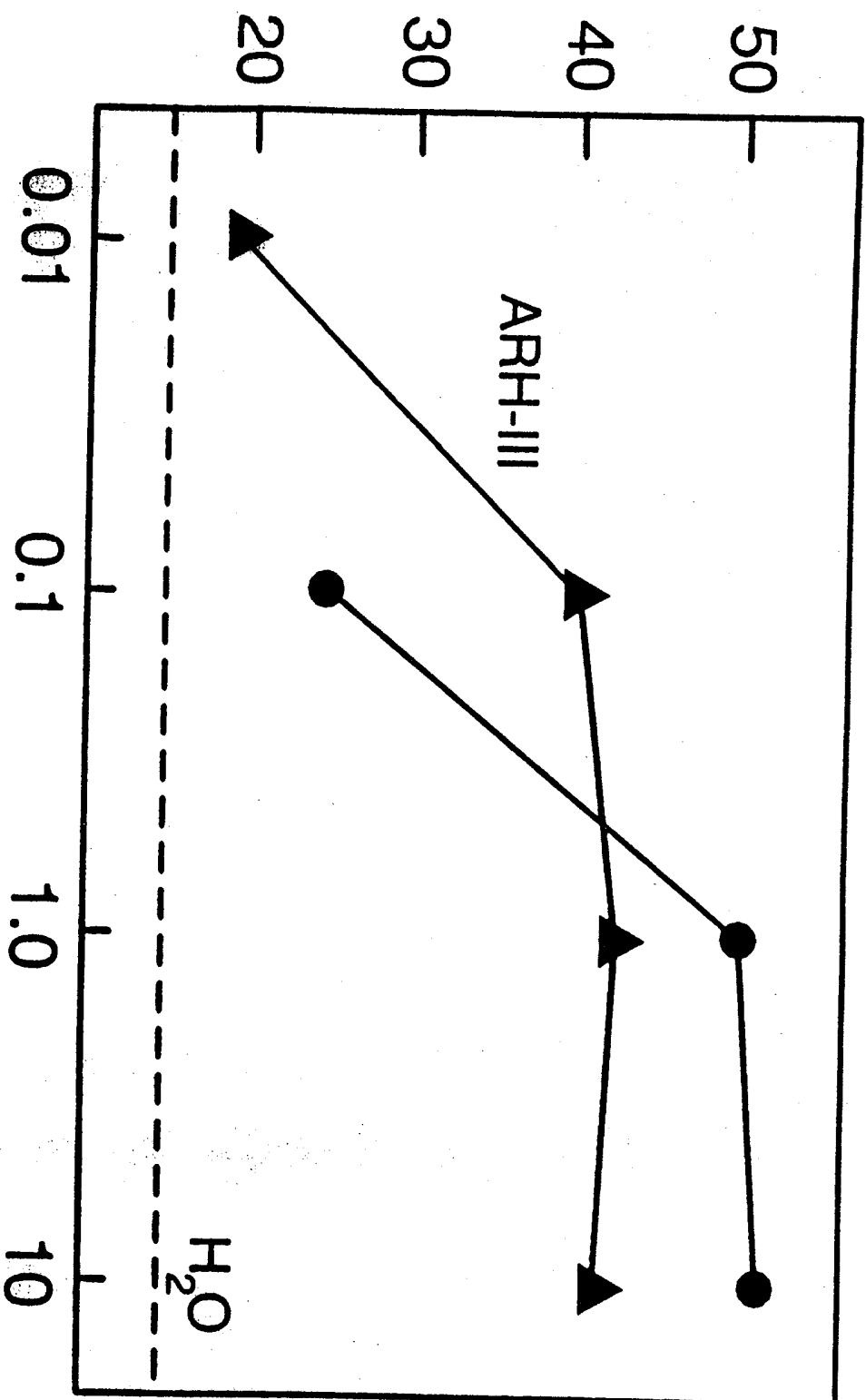


021760	26. IV. 91	ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	Přil.
--------	------------	----------------------------------	-------



221760	26. IV. 91	ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	PAT.
--------	------------	----------------------------------	------

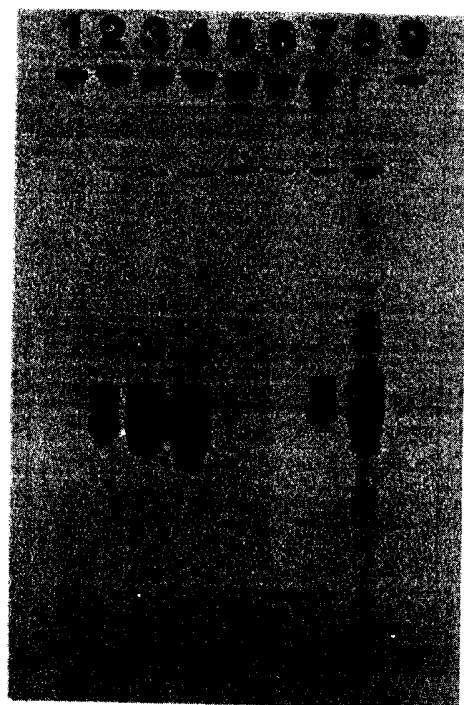
7



41	021760
26. IV. 91	
ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	
PM.L.	

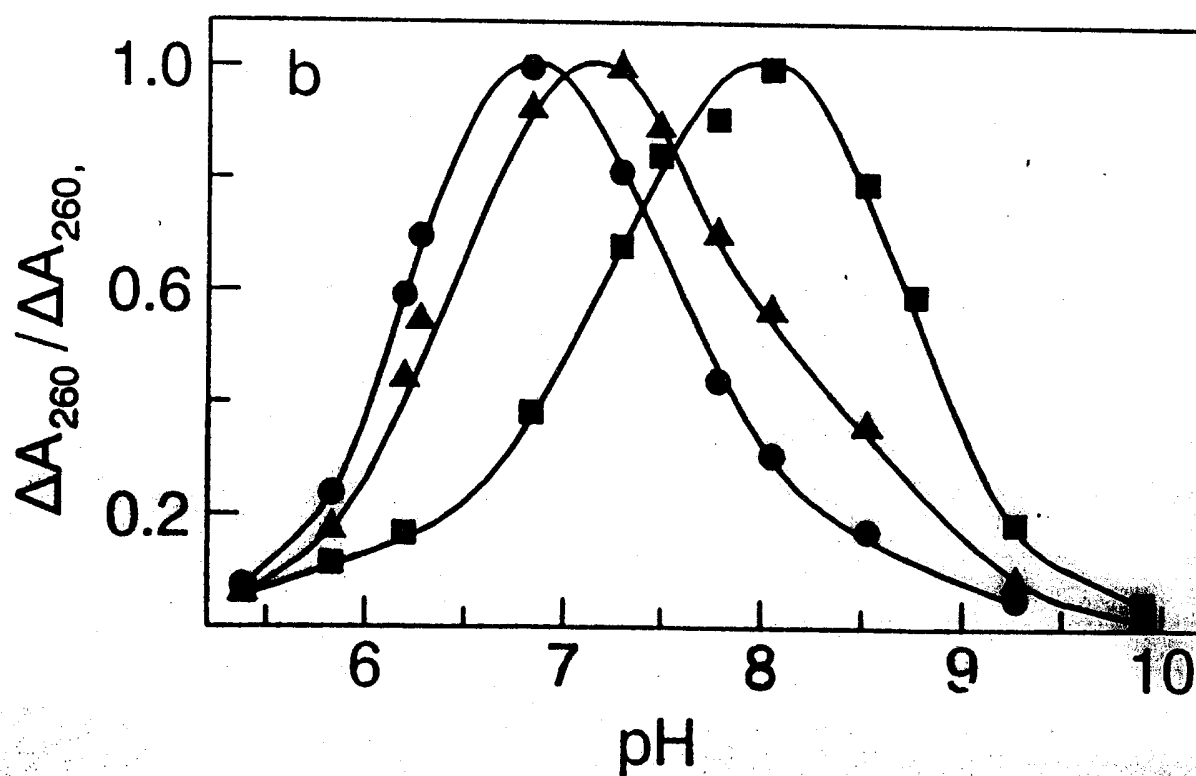
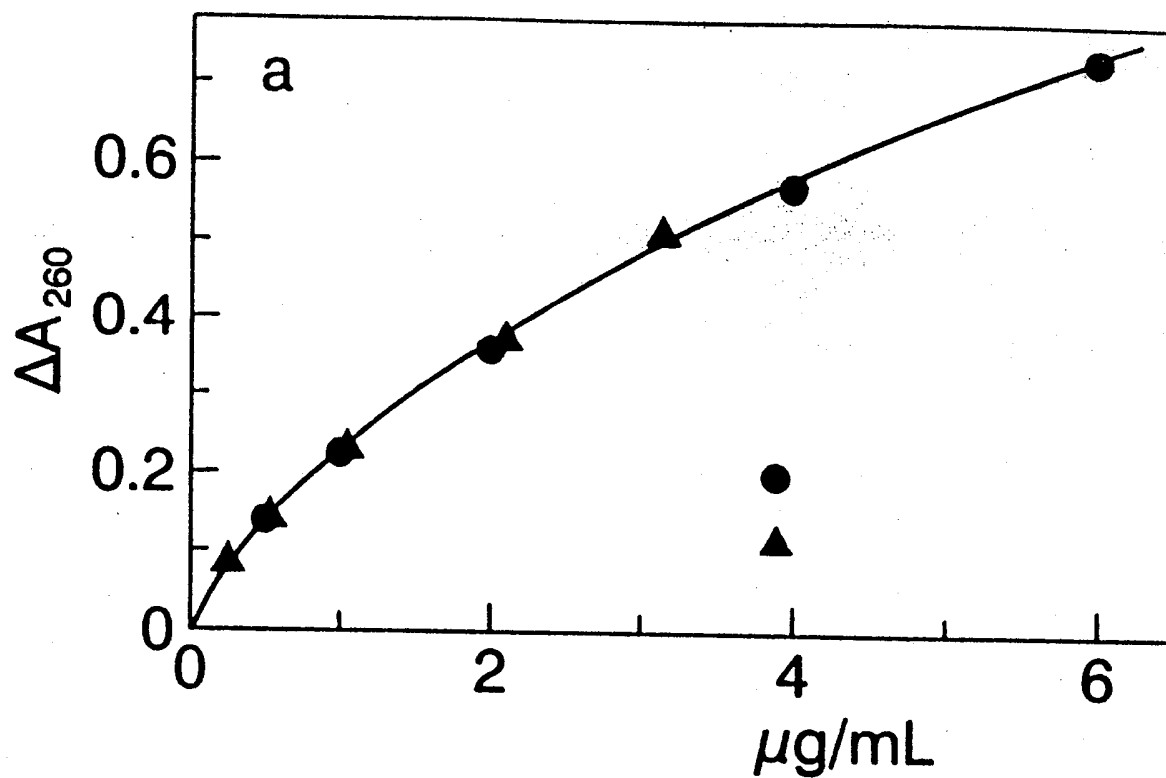
61	021760	BRNO	26. IV. 91	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PAT.
----	--------	------	------------	----------------------------------	------

6



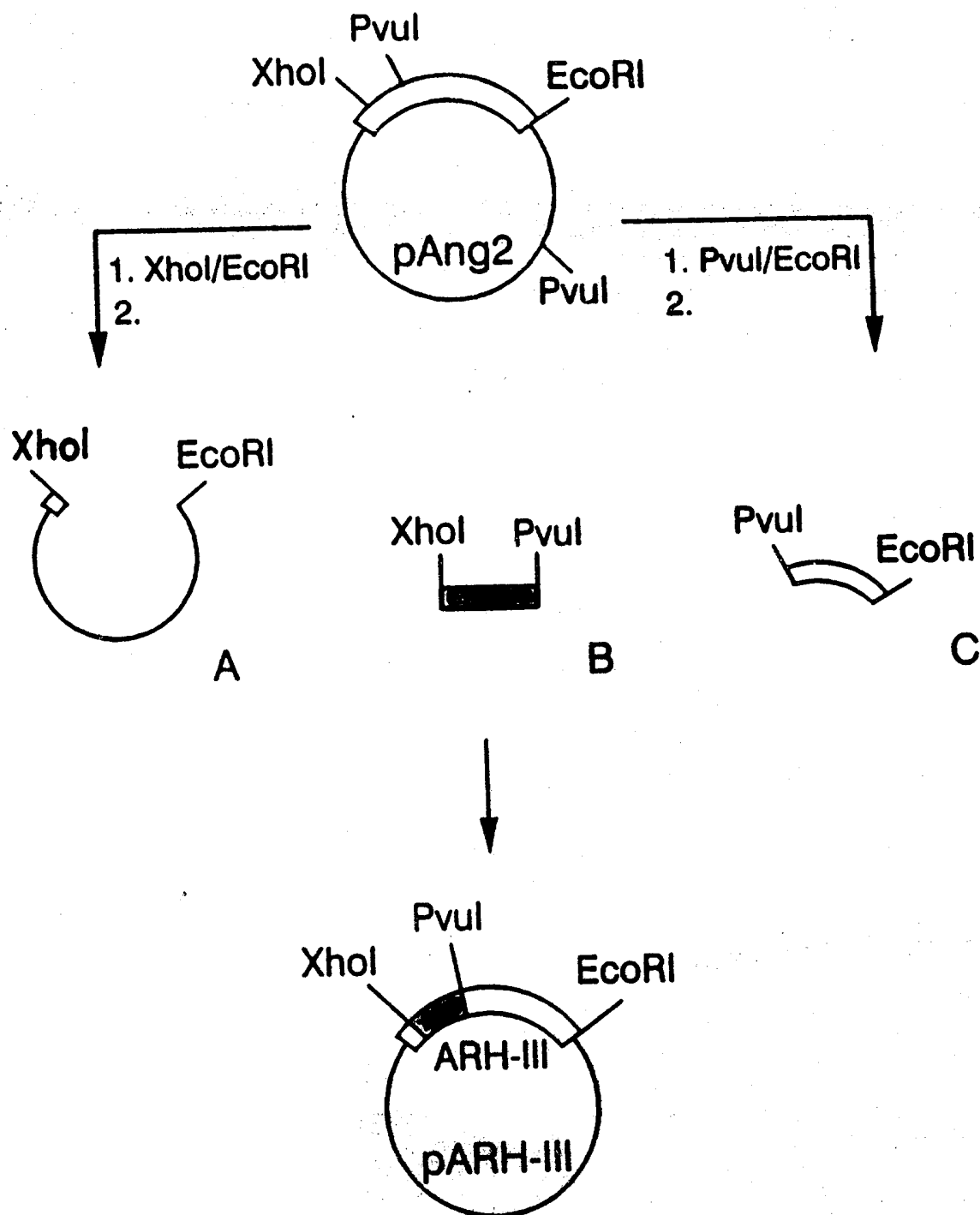
21760
 26. IV. 91
 ÚŘAD
 PROVĚRNÁŘE
 A OBJEVY
 PŘIL.

5



4	021760	26. IV. 91	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PAT.
---	--------	------------	----------------------------------	------

3



a

RNase A

1 * * * * 10 * * * * 20 * *
K E T A A A K F E R Q H M D S S T S A A S S S N Y C ...

1 10 20
< Q D N S R Y T H F L T Q H Y D A K F Q G R D D R - - Y C ...

ARH-III

1 10 20
< Q D N S R Y T K F E R Q H M D S S T S A A S D R - - Y C ...

b

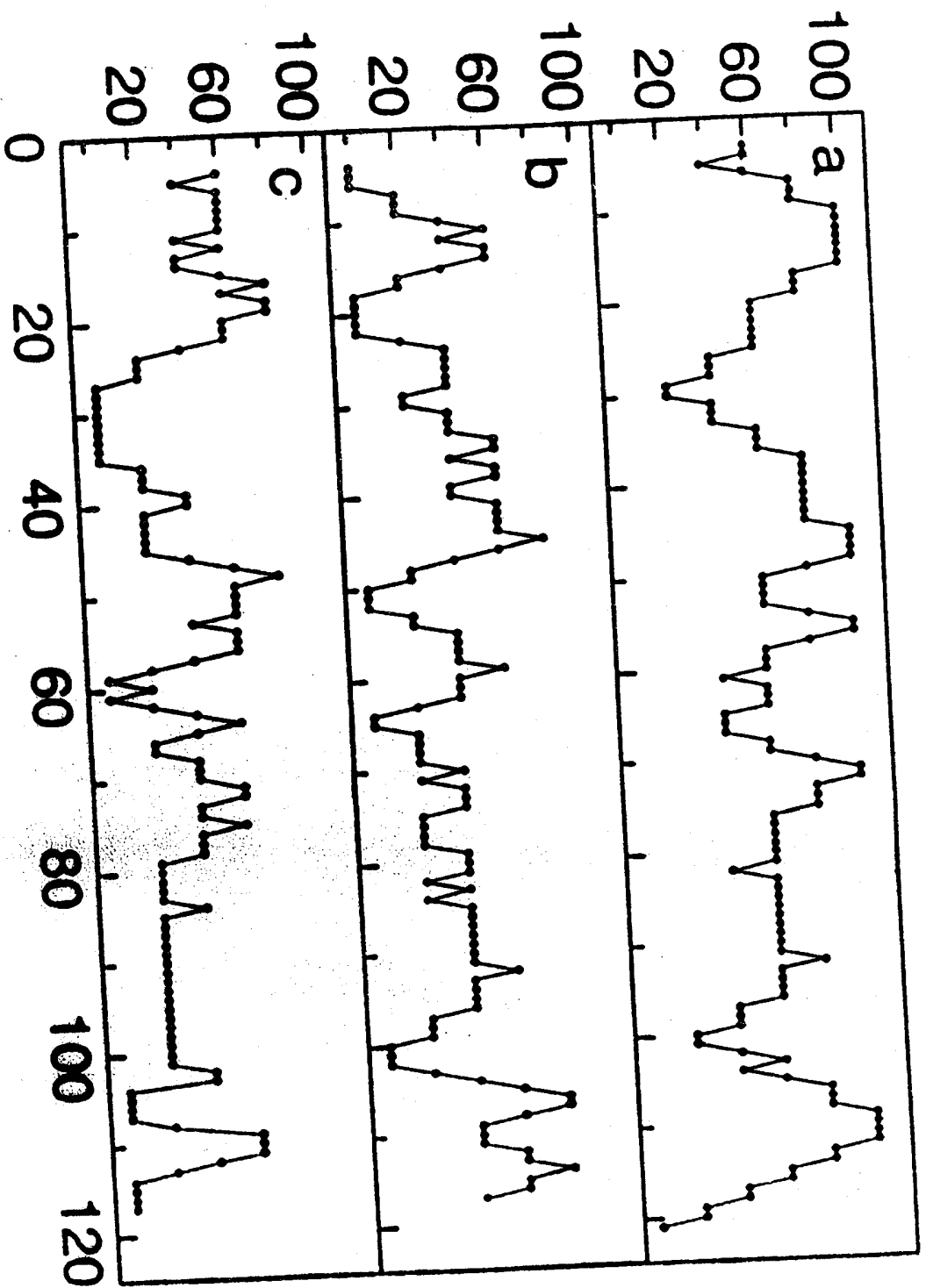
S R Y T K F E R Q H
5' TCG AGG TAT ACA AAA TTC GAA CGC CAG CAC
3' | TCG AGG TAT ACA AAA TTC GAA CGC CAG CAC
| CC ATA TGT TTT AAG CTT GCG GTC GTG

M D S S T S A A S D
ATG GAC TCT TCG ACA AGC GCT GCC TCC GAT | 3'
TAC CTG AGA AGC TGT TCG CGA CGG AGG C | 5'

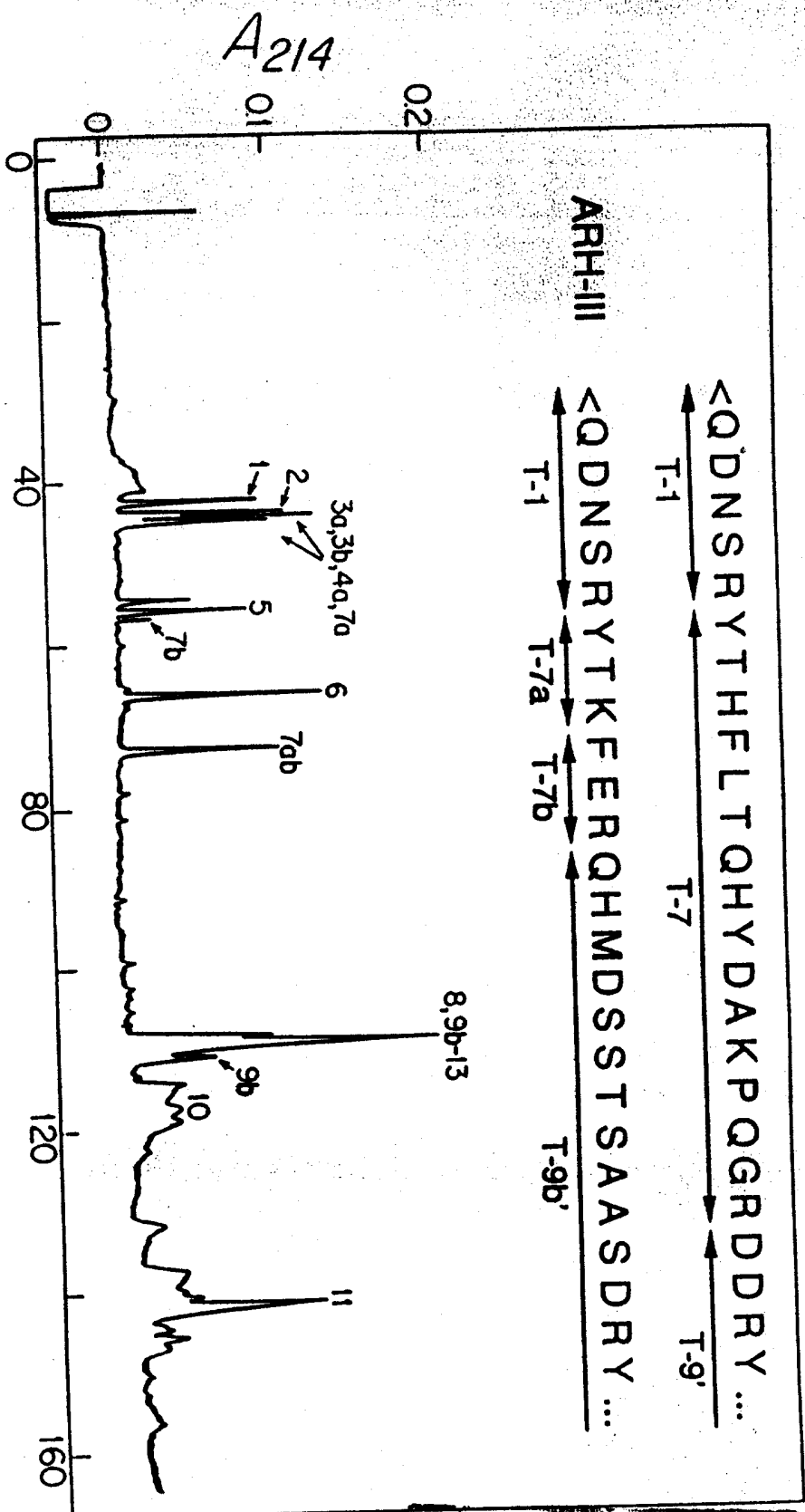
2

021760
26. IV 91
UŠAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
Přil.

021760
26. IV. 91
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.



4



021760	26. IV 91	URAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PATL.
--------	-----------	----------------------------------	-------